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

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

Ana Beatriz Rigueti Zanardo

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

**Piracicaba
2015**

Ana Beatriz Rigueti Zanardo
Bacharel em Ciências Biológicas

**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
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011**

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

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

Piracicaba
2015

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

Zanardo, Ana Beatriz Rigueti

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 / Ana Beatriz Rigueti Zanardo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
153 p. : il.

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

1. *Beauveria* 2. *Isaria* 3. Entomopatógeno 4. Controle biológico 5. Análise filogenética
6. Região intergênica MzIGS3 7. Cultivos agrícolas 8. Vegetação nativa I. Título

CDD 589.24
Z27a

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

À Deus,

Pelo infinito amor e divina misericórdia concedida em todos os dias da minha vida

AGRADEÇO

Aos meus amados pais, Walter e Sueli R. Zanardo

Exemplos de honestidade, luta, perseverança, dedicação, amor e paciência

DEDICO

Ao meu companheiro, Miguel Mazuy Botelho

Pelo amor, paciência, carinho, proteção e pela compreensão em renunciar muitos momentos de convivência

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior pela orientação, oportunidades concedidas, ensinamentos transmitidos, confiança, apoio e inestimável colaboração durante meu doutoramento;

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

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial a toda a equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos pela convivência e conhecimentos compartilhados;

À minha querida Rafaela Colonhez Prado, bolsista de iniciação científica, por ter me ajudado com tanta responsabilidade, dedicação e também pela amizade, carinho, apoio e confiança construída durante nosso período de convivência;

À Elisa Souza Domingues pela imprescindível ajuda com a criação de *Galleria mellonella* bem como pela amizade, apoio, alegria transmitida, carinho, sugestões enfim, pela agradável e indispensável companhia;

Aos amigos Luiz Henrique Costa Mota, Janayne Maria Rezende, Vanessa da Silveira Duarte e Danielle Thomazoni pela amizade, valiosas sugestões, boas risadas e apoio cedido nos momentos difíceis;

Ao pesquisador Dr. Luis Garrigós Leite, do Instituto Biológico de Campinas, por diversas vezes ter cedido *Galleria mellonella* para a manutenção da criação;

À Prof. Dra. Clarice G. B. Demetrio e aos alunos MSc. Rafael de Andrade Moral e MSc. Thiago de Paula Oliveira do Departamento de Ciências Exatas pelo auxílio na análise estatística do capítulo 3 desta tese;

Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento do Departamento de Genética da ESALQ-USP por ter cedido espaço para o desenvolvimento da pesquisa com biologia molecular e também aos seus alunos de pós-graduação pela calorosa acolhida e convivência;

À Dra. Maria Imaculada Zucchi e aos alunos Jaqueline Bueno de Campos e MSc. Alessandro Alves Pereira do Laboratório de Diversidade Genética e

Melhoramento do Departamento de Genética da ESALQ-USP pela valiosa ajuda e ensinamentos na parte de biologia molecular e auxílio nas análises do capítulo 4 desta tese;

Aos colaboradores do projeto SISBIOTA, Prof. Dr. Uemerson Silva da Cunha (FAEM/UFPEL), Prof. Dr. Edmilson Santos Silva (UFAL), Dra. Erika P. J. Britto (UFMT) e Dr. Fernando Hercos Valicente (EMBRAPA Milho e Sorgo) pelo esforço, dedicação e realização das coletas de solo junto às suas equipes;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou o projeto SISBIOTA BRASIL (FAPs Nº 47/2010) permitindo assim o desenvolvimento da presente pesquisa;

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

À minha família, especialmente meus pais, Walter e Sueli, agradeço por serem meus exemplos de vida, pela dedicação, incentivo, amor, inúmeras preces realizadas em todos os momentos, apoio e esforços que nunca foram medidos;

Ao meu porto seguro e companheiro, Miguel Mazuy Botelho, por tanta dedicação, cuidado, proteção e incansáveis estímulos e incentivos que tem me oferecido ao longo dos nossos dez anos que jornada.

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram comigo durante esta etapa profissional, perto ou distante, os meus sinceros agradecimentos!

"O meu olhar alcança o longe. Contemplo o território que me separa da concretização de meu desejo. O destino final que o olhar já reconhece como recompensa, aos pés se oferece como lonjura a ser vencida. Mas não há pressa que seja capaz de diminuir esta distância. Estamos sob a prevalência de uma imposição existencial, regra que ensina, que entre o ser real e o ser desejado, há o senhorio inevitável do tempo das esperas".

Pe. Fábio de Melo

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
Referências	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Biomas brasileiros	19
2.2 Importância dos fungos entomopatogênicos	21
2.3 Ocorrência e abundância dos fungos entomopatogênicos no solo	24
2.4 Fungo entomopatogênico <i>Metarhizium</i> spp.....	29
2.4.1 Taxonomia: Abordagem Geral	29
2.4.2 Importância do gênero.....	32
2.4.3 Diversidade genética	34
Referências	37
3 ABUNDÂNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS DA ORDEM HYPOCREALES EM SOLOS DE DIFERENTES CULTIVOS E VEGETAÇÃO NATIVA DE ÁREAS REPRESENTATIVAS DE CINCO BIOMAS BRASILEIROS.....	49
Resumo	49
Abstract	49
3.1 Introdução	50
3.2 Material e Métodos	52
3.2.1 Amostragem do solo	52
3.2.2 Isolamento de fungos entomopatogênicos	54
3.2.2.1 Método utilizando meio seletivo	55
3.2.2.2 Método utilizando “Insect bait”	56
3.2.3 Análise estatística dos dados	57
3.3 Resultados	59
3.3.1 Isolamento de fungos entomopatogênicos das amostras de solo com meio seletivo e “Insect bait”	59
3.3.2 Abundância de fungos entomopatogênicos com meio seletivo	60
3.3.3 Ocorrência de fungos entomopatogênicos com “Insect bait”	71
3.4 Discussão	81
Referências	86
Apêndice	93
4 DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Metarhizium</i> spp. ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLO DE DIFERENTES CULTIVOS E VEGETAÇÃO NATIVA DE ÁREAS REPRESENTATIVAS DE CINCO BIOMAS BRASILEIROS.....	95

Resumo	95
Abstract.....	95
4.1 Introdução.....	96
4.2 Material e Métodos	99
4.2.1 Origem dos isolados	99
4.2.2 Extração do DNA, Amplificação e Sequenciamento	101
4.2.3 Montagem das sequências consenso e alinhamento múltiplo	103
4.2.4 Análise de Diversidade genética e Variância molecular (AMOVA)	103
4.2.5 Rede de Haplótipos e Inferência Filogenética Bayesiana.....	104
4.2.6 Análise de Máxima Verossimilhança e Inferência Filogenética Bayesiana com a região 5'-TEF	106
4.3 Resultados.....	107
4.3.1 Diversidade genética	107
4.3.2 Variância molecular (AMOVA)	113
4.3.3 Rede de Haplótipos	115
4.3.4 Distribuição dos haplótipos de <i>Metarhizium</i> sp.	118
4.3.5 Inferência Filogenética Bayesiana	120
4.3.6 Filogenia dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	125
4.4 Discussão	128
Referências.....	133
Anexo.....	141

RESUMO

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

Os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* (Ordem Hypocreales), são comumente encontrados em solo onde sobrevivem de maneira saprofítica ou como endofíticos do sistema radicular das plantas. Informações sobre a composição destas espécies bem como sua diversidade, distribuição e associação com diferentes tipos de cultivos e vegetação nativa são escassas no Brasil. O presente estudo foi desenvolvido para comparar a abundância de fungos entomopatogênicos e a diversidade genética de isolados de *Metarhizium* spp. em amostras de solo de cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, em cinco estados brasileiros que representam os biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa, em duas estações (seca e úmida) nos anos de 2012 e 2013. O isolamento dos fungos foi realizado com meio seletivo e “Insect bait” utilizando *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*. Nos estudos de diversidade genética de *Metarhizium* spp. foram utilizadas sequências de DNA da região MzIGS3. Representantes dos haplótipos revelados nesta análise tiveram a região 5'-TEF sequenciada para identificação específica. Fungos entomopatogênicos foram isolados de 86% das 1.056 amostras de solo sendo *Metarhizium* o gênero predominante (66% das amostras de solo), seguido por *Beauveria* (41,9%) e *Isaria* (10,8%). Em geral, as maiores densidades de fungos entomopatogênicos foram obtidas nos biomas Amazônia e Cerrado e as menores densidades detectadas no bioma Caatinga. *Metarhizium* spp. foi detectado em maior número de amostras de solo em vegetação nativa e cultivos anual e perene do Cerrado. A frequência de *Isaria* spp. foi baixa nas amostras de solo, sendo detectado em maior número de amostras nos solos com cultivos anuais e vegetação nativa na Amazônia e Caatinga. *Metarhizium* spp. foi geralmente encontrado em um maior número de amostras coletadas na estação úmida em comparação com as coletas da estação seca, por outro lado *Beauveria* spp. foi superior na estação seca. A diversidade dos isolados de *Metarhizium* spp. provenientes de áreas de vegetação nativa foi maior do que dos isolados de cultivos anuais e perenes. Seis linhagens foram encontradas neste estudo; *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. pingshaense* e três espécies indeterminadas. *M. robertsii* foi a linhagem predominante (65% dos isolados) sendo encontrado em áreas com vegetação nativa e cultivos anual e perene dos cinco biomas. *Metarhizium* sp. indet. 1 apresentou a maior diversidade haplotípica dentre as linhagens estudadas. Uma nova linhagem, não caracterizada taxonomicamente, *Metarhizium* sp. indet. 3, foi encontrada predominantemente na Caatinga. Somente na Amazônia foram encontradas todas as linhagens. O conhecimento da composição das populações de fungos entomopatogênicos nativos bem como sobre a filogenia, diversidade e distribuição dos haplótipos de *Metarhizium* spp. em solos brasileiros, gerado neste estudo, poderá servir como subsídio para o desenvolvimento de estratégias de conservação e maximização do controle biológico natural de pragas.

Palavras-chave: *Beauveria*; *Isaria*; Cultivos agrícolas; Vegetação nativa; Densidade; Diversidade; Haplótipos; Filogenia; Região intergênica MzIGS3

ABSTRACT

Abundance of entomopathogenic fungi of the order Hypocreales and genetic diversity of *Metarhizium* spp. isolated from soil samples of areas representative of five Brazilian biomes

Entomopathogenic fungi of the genera *Metarhizium*, *Beauveria* and *Isaria* (order Hypocreales) are associated to the soil where they survive saprofitically or as endophytes of the plants root system. Information on the species composition and its diversity, distribution and association of these fungi with different types of crops and native vegetation are scarce in Brazil. The present study was carried out to compare the abundance of entomopathogenic fungi and the genetic diversity of *Metarhizium* spp. Isolated from soil samples from annual and perennial crops and native vegetation in five Brazilian states that represent the biomes Amazon, Cerrado, Caatinga, Atlantic Forest and Pampa, in two seasons (wet and dry) in the years 2012 and 2013. The isolation of fungi was performed with selective medium and "Insect bait" using *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. DNA sequences of the region MzIGS3 were used in genetic diversity studies of *Metarhizium* spp. Representatives haplotypes revealed in the diversity analysis had the 5'-TEF region sequenced for species identification. Entomopathogenic fungi were isolated from 86% of 1,056 soil samples and *Metarhizium* was the predominant genus (66% of soil samples), followed by *Beauveria* (41.9%) and *Isaria* (10.8%). In general, the highest densities of entomopathogenic fungi were obtained in the Amazon and Cerrado biomes and the lowest densities were detected in the Caatinga biome. *Metarhizium* spp. was detected in a greater number of soil samples from native vegetation and annual and perennial crops of Cerrado. The frequency of *Isaria* spp. was low in soil samples being detected in a greater number of soils with annual crops and native vegetation in the Amazon and Caatinga. *Metarhizium* spp. was usually found in a greater number of samples collected during the wet season compared to the collections in the dry season. On the other hand, *Beauveria* spp. was higher in the dry season. The diversity of isolates of *Metarhizium* spp. from areas of native vegetation was greater than that obtained from annual and perennial crops. Six lineages were found in this study; *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. pingshaense* and three indeterminate species. *M. robertsii* was the predominant (65% of isolates) found in areas with native vegetation and in the annual and perennial crops of the five biomes. *Metarhizium* sp. indet. 1 showed the greatest haplotype diversity among the strains studied. A new strain, not characterized taxonomically, *Metarhizium* sp. indet. 3, was found predominantly in the Caatinga. Only in the Amazon, all lineages were found. The knowledge on species composition of entomopathogenic fungi as well as about phylogeny, diversity and distribution of haplotypes of *Metarhizium* spp. in Brazilian soils, generated in this study, may be useful for the development of strategies for conservation and maximization of natural biological control of pests.

Keywords: *Beauveria*; *Isaria*; Agricultural crops; Native vegetation; Density; Diversity; Haplotypes; Phylogeny; Intergenic region MzIGS3

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade do mundo (MITTERMEIER et al., 2005) sendo formado por seis biomas que juntos abrangem uma extensão de mais de 8,5 milhões de km² do território nacional (IBGE, 2004; IBGE, 2013). No presente estudo, nossos alvos foram os biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa. Cada um deles representa uma área do espaço geográfico definidas por macroclima uniforme e determinada fitofisionomia ou formação vegetal predominante que, associado à fauna e outros organismos vivos e às condições ambientais, possuem estrutura e funcionalidades peculiares, ecologia própria (COUTINHO, 2006).

Os fungos foram os primeiros patógenos a serem utilizados no controle biológico de artrópodes (DAVIDSON, 2012). Dentre eles, *Metarhizium* spp. (Hypocreales: Clavicipitaceae), *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. (Hypocreales: Cordycipitaceae) são os mais utilizados para o controle de insetos e ácaros bem como na forma de ingredientes ativos de produtos comerciais (FARIA; WRAIGHT, 2007). Estes fungos apresentam ampla distribuição geográfica ocorrendo nos trópicos e nas regiões subártica e subantártica (JARONSKI, 2007; ZIMMERMANN, 2007a, 2007b, 2008), podendo ser encontrados causando doenças em grande número de hospedeiros, como endofíticos de plantas, colonizadores da rizosfera ou sobrevivendo no solo como saprofíticos.

O solo é o ambiente mais apropriado para recuperação destes fungos entomopatogênicos, pois serve como reservatório natural possibilitando a sobrevivência dos propágulos fúngicos quando não encontram um hospedeiro (MEDO; CAGÁN, 2011; VEGA et al., 2012). A composição das espécies de fungos entomopatogênicos bem como sua ocorrência no solo pode ser significativamente influenciada por fatores relacionados às características do solo, condições climáticas, insumos e práticas agrícolas (JARONSKI, 2007; MEYLING; EILENBERG, 2007; VEGA et al., 2012). Além desses fatores, os variados métodos utilizados para isolamento desses fungos têm mostrado padrões de ocorrência diversificados entre os estudos já realizados.

O Brasil apresenta o maior programa de sucesso utilizando produtos comerciais e não comerciais à base de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 para o controle do complexo de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) incluindo

Mahanarva fimbriolata (Stal, 1854) e *M. posticata* (Stal, 1855) em cana-de-açúcar e *M. fimbriolata*, *Deois flavopicta* (Stal, 1854) e *Notozulia entreriana* (Berg, 1879) em pastagem (ALVES et al., 2008). Esse fungo tem proporcionado níveis eficientes no controle de cigarrinhas estimando-se que sua aplicação anual ultrapasse 2 milhões de hectares em áreas de cana-de-açúcar (J.E.M. de Almeida, Instituto Biológico, Brasil, comunicação pessoal). Apesar da ampla utilização de *M. anisopliae* para o controle de cigarrinhas, pouco se conhece sobre a diversidade, distribuição e ecologia das espécies atualmente reconhecidas (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009) em ambientes naturais e agrícolas no Brasil (REZENDE et al., 2015).

Técnicas moleculares têm sido aplicadas em estudos de ecologia e virulência de fungos entomopatogênicos especialmente para *Metarhizium*, que é gênero mais bem estudado a nível molecular e bioquímico (ZIMMERMANN, 2007b). A diversidade genética e estrutura populacional deste fungo tem sido extensamente estudada para compreender a relação dos diferentes genótipos com o hospedeiro e/ou habitat em escala regional ou global, bem como permite monitorar sua persistência e comportamento no ambiente que foi introduzido (ENKERLI; WIDMER, 2010). Diversos métodos têm sido empregados para análise de frequência gênica em estudos de genotipagem como RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), RAPD (Polimorfismo de DNA randômico) e os microssatélites (SSR - Simple sequence repeat) (ENKERLI; WIDMER, 2010). Entretanto, são poucos os estudos desenvolvidos utilizando sequências de DNA obtidas com um gene para estudos de diversidade haplotípica e nucleotídica.

Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido para comparar a abundância de três fungos entomopatogênicos e caracterizar a diversidade genética de *Metarhizium* spp. isolados de amostras de solo de áreas de vegetação nativa, cultivo anual e perene, coletados em duas estações (úmida e seca), durante dois anos (2012 e 2013), em cinco áreas representativas dos biomas brasileiros (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa) utilizando os métodos de isolamento meio seletivo e "Insect bait" com lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) e larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae).

Referências

- ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMAI, M.A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 69-110.
- COUTINHO, L.M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 13–23, 2006.
- DAVIDSON, E.W. History of Insect Pathology. In: VEGA, F.E.; KAYA, H.K. (Ed.). **Insect Pathology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2012. chap. 2, p. 13-28.
- ENKERLI, J.; WIDMER, F. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 17–37, 2010.
- FARIA, M.R.D.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, n.3, p. 237–256, 2007.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2004. **Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2013. **Área Territorial Brasileira**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_territ_area.shtm>. Acesso em: 23 fev. 2015.
- JARONSKI, S.T. Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes: A critical examination of what we (think) we know. In: EKESI, S.; MANIANIA, N.K. (Ed.). **Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management**. Kerala: Research Signpost, 2007. p. 91-144.
- MEDO, J.; CAGÁN, L. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, Orlando, v. 59, n. 2, p. 200–208, 2011.
- MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 43, n. 2, p. 145–155, 2007.
- MITTERMEIER, R.A.; DA FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. A Brief History of Biodiversity Conservation in Brazil. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 601–607, 2005.

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.

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

VEGA, F.E.; MEYLING, N. V.; LUANGSA-ARD, J.J.; BLACKWELL, M. Fungal Entomopathogens. In VEGA, F.E.; KAYA, H.K. (Ed.). **Insect Pathology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2012. chap. VI, 171-220.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 553–596, 2007a.

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

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 865–901, 2008.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomas brasileiros

O território brasileiro em sua vasta extensão abriga grande biodiversidade tropical que não está somente limitada às espécies, mas estende-se também às fitofisionomias (característica morfológica da comunidade vegetal), às formações (unidade fisionômica relacionada às formas de vegetação), ao espaço que compreende as diferentes formas de vida e consequentemente, aos biomas (COUTINHO, 2006). Um conceito mais moderno e com concepção ecológica e prática para Bioma, foi proposto por Coutinho (2006) que o considera como *“uma área do espaço geográfico, com dimensões de até mais de um milhão de quilômetros quadrados, que tem por características a uniformidade de um macroclima definido, de uma determinada fitofisionomia ou formação vegetal, de uma fauna e outros organismos vivos associados, e de outras condições ambientais, como a altitude, o solo, alagamentos, o fogo, a salinidade, entre outros. Estas características todas lhe conferem uma estrutura e uma funcionalidade peculiares, uma ecologia própria”*.

Atualmente são reconhecidos seis biomas, porém nesta tese serão mencionados apenas os cinco biomas que foram alvo do presente estudo. Amazônia é o maior bioma brasileiro (ocupa 49,3% do território nacional) abrangendo a região Norte e uma pequena área do Maranhão e Mato Grosso. A Floresta Amazônica representa uma das três grandes florestas tropicais do mundo apresentando a maior reserva de diversidade biológica, com indicações de que abrigue pelo menos metade de todas as espécies vivas do planeta. É formada principalmente por Floresta Densa e Aberta, Floresta Estacional, Floresta de Igapó, campos alagados, várzeas, Savanas, refúgios montanhosos, Campinarana e formações pioneiras, sendo portanto, um mosaico de habitats bastante diferenciados (IBGE, 2004).

Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro com ≈ 2 milhões de km², alcança os estados da região Centro-Oeste incluindo o Distrito Federal e também estados de outras regiões brasileiras como Tocantins, Bahia, Maranhão, Piauí, Minas Gerais, Paraná e São Paulo (IBGE, 2004). A vegetação neste bioma apresenta fisionomias que englobam formações florestais, savânicas e campestres. As formações florestais compreendem Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e o Cerradão. As formações

savânicas são compostas pelo Cerrado Sentido Restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda. Por outro lado, as formações campestres englobam Campo Sujo, Campo Limpo e o Campo Rupestre (RIBEIRO; WALTER, 1998). Considerado um dos “hotspots” mundiais de biodiversidade, o Cerrado apresenta uma grande abundância de espécies endêmicas porém, tem sofrido excepcional perda de habitat, devido à expansão das áreas transformadas em pasto e monocultivos (KLINK; MACHADO, 2005).

A Mata Atlântica é formada por um conjunto de formações florestais que se diferenciam ao longo da costa litorânea acompanhando o clima das regiões (Florestas: Ombrófila Densa, Ombrófila Mista, Estacional Semidecidual, Estacional Decidual e Ombrófila Aberta) associados a restingas, manguezais e campos de altitude, que se estendiam originalmente por aproximadamente 1,3 milhão de km² desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (15 estados do território brasileiro). Hoje os remanescentes de vegetação nativa estão reduzidos a cerca de 8% por isso, foi aprovada a Lei 11.428 de 2006 para a conservação e recuperação ambiental da Mata Atlântica. Este bioma também é considerado um dos principais “hotspots” mundiais, apresentando alta riqueza de espécies que se encontram ameaçadas devido a drástica redução da área original (IBGE, 2004; MMA, 2015).

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, com uma área de 844.453 mil km² (10% do território nacional), adaptado às condições semiáridas, engloba alguns estados do Nordeste e uma pequena porção de Minas Gerais. Este bioma é dominado pela vegetação do tipo "Savana Estépica", vegetação com predomínio de árvores baixas e arbustos que, em geral, perdem as folhas no período seco (espécies caducifólias), em resposta à escassez de água, e muitas espécies de cactáceas (IBGE, 2004; MMA, 2015). A forte irregularidade climática neste bioma é marcante, exibindo os valores meteorológicos mais extremos do país, apresentando forte insolação, mais baixa nebulosidade, elevadas taxas de evaporação e, sobretudo, os mais baixos índices pluviométricos (menos de 1000 mm/ano) com grande variabilidade espacial e temporal (ZAPPI, 2008).

O bioma Pampa, no Brasil, está restrito ao estado do Rio Grande do Sul, ocupando área de 176.496 km² que corresponde a 63% do território estadual e a 2,07% do território brasileiro. A vegetação dominante é de gramíneas entremeadas por Floresta Mesófila, florestas subtropicais (especialmente floresta com araucária) e Floresta Estacional. Caracteriza-se pela grande riqueza de espécies herbáceas e

várias tipologias campestres, compondo em algumas regiões, ambientes integrados com a Floresta de Araucária. A pecuária extensiva sobre os campos nativos era a principal atividade econômica da região quando a progressiva introdução e expansão das monoculturas e das pastagens com espécies exóticas levou a uma rápida degradação e descaracterização das paisagens naturais do Pampa. Por estar situado na região Sul do Brasil está submetido a temperaturas amenas e chuvas regulares distribuídas ao longo do ano (IBGE, 2004; IBGE, 2012; MMA, 2015).

O agravamento dos problemas ambientais, observado em todos os biomas, como queimadas, aumento de gás carbônico e o consequente efeito no aquecimento do Planeta, o crescimento do buraco na camada de ozônio, o avanço das fronteiras agrícolas, entre outros fatores, têm resultado além de uma “crise de extinção”, ao nível de espécies, a “crise dos biomas”, muito mais ampla e grave, pois, resulta na destruição dos ambientes naturais, onde as espécies surgem e se desenvolvem (COUTINHO, 2006). Desta forma, o conhecimento sobre a existência, distribuição, abundância e diversidade dos seres, com atenção especial aos fungos, que ocorrem em tais biomas e que estão em um ambiente sujeito ou não à interferência humana é importante para se poder traçar estratégias para sua conservação.

2.2 Importância dos fungos entomopatogênicos

Os primeiros patógenos a serem utilizados no controle biológico de insetos foram os fungos (DAVIDSON, 2012) que em sua grande maioria estão concentrados na ordem Hypocreales (SHAPIRO-ILAN; BRUCK; LACEY, 2012). A maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos já relatados ocorre no Brasil, sendo que, desses, mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica (ALVES, 1998). A rota de infecção mais comum utilizada por esses microrganismos é através do tegumento embora a infecção via trato digestivo também seja possível (INGLIS; ENKERLI; GOETTEL, 2012). A transferência dos propágulos deste patógeno é realizada horizontalmente o que proporciona a ocorrência de epizootias, sendo o vento e a chuva os principais fatores abióticos responsáveis pela sua dispersão (SHAPIRO-ILAN; BRUCK; LACEY, 2012).

Dentre os fungos entomopatogênicos mais utilizados tanto no controle de insetos e ácaros como na forma de ingredientes ativos de produtos comerciais estão, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, *Isaria*

fumosorosea Wize e *Lecanicillium* spp. (Ascomycota: Hypocreales: Cordycipitaceae) e *Metarhizium* spp. (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae) (FARIA; WRAIGHT, 2007). De acordo com a última estatística realizada por Faria e Wraight, (2007), 171 micoinseticidas e micoacaricidas foram desenvolvidos nas últimas quatro décadas. No Brasil, 55% dos produtos comercialmente disponíveis ou em processo de registro são a base de *M. anisopliae*, seguido por *B. bassiana* (30,0%), *Lecanicillium* spp. (7,5%) e “*Sporothrix insectorum*” de Hoog & H.C. Evans (7,5%) (MICHEREFF FILHO et al., 2009).

A importância do gênero *Metarhizium* foi descrita no item 2.4.1 desta tese. O gênero *Beauveria* é conhecido por causar doença em artrópodes, apresenta hábito saprofítico e endofítico, ocorrendo em regiões temperadas e tropicais (ZIMMERMANN, 2007a). Estudos moleculares demonstraram que, caracteres morfológicos são insuficientes para a identificação das espécies neste gênero, especialmente por *B. bassiana* ser um complexo formado por espécies crípticas globalmente distribuídas, infectando diversas ordens de insetos (REHNER; BUCKLEY, 2005; REHNER et al., 2011) e ocorrendo em habitats naturais e agrícolas (MEYLING et al., 2009). Após análise com quatro genes Rehner et al., (2011) reconheceram doze linhagens terminais com seis clados representados por espécies conhecidas, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica* Bissett & Widden, *B. malawiensis* S.A. Rehner & Aquino de Muro, *B. vermiconia* de Hoog & V. Rao, *B. amorpha* (Hohn.) Minnis, S.A. Rehner & Humber, comb. nov. e seis espécies novas incluindo *B. asiatica* S.A. Rehner & Humber, *B. australis* S.A. Rehner & Humber, *B. kipukae* S.A. Rehner & Humber, *B. pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber, *B. sungii* S.A. Rehner & Humber e *B. varroae* S.A. Rehner & Humber. Os isolados brasileiros encontrados neste estudo foram *B. amorfa*, *B. bassiana* s.s. e *B. caledonica*.

O fungo *B. bassiana* foi utilizado no Brasil sob diversas estratégias incluindo introdução inundativa para o controle de cupim de montículo em pastagem do gênero *Cornitermes* (Isoptera) e pragas de cultivos protegido como *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) e o ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Kock (Acari: Tetranychidae) (ALVES et al., 2008), iscas atrativas para controle de coleópteros como *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 e *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (LI et al., 2010; LOPES et al., 2013b; PAULI et al., 2011) e propágulos fúngicos impregnados em tecido têxtil associado a armadilha de auto-inoculação para o

controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (MOTA, 2013). Durante o processo de infecção, esta espécie libera metabólitos secundários como a beauvericina, que não são necessários para seu crescimento e reprodução mas, estão relacionados à patogenicidade e virulência do fungo. A colonização endofítica de isolados de *B. bassiana* foi demonstrada em quatorze espécies de plantas incluindo milho, tomate, banana e batata (VEGA, 2008). *B. bassiana* foi recuperado de raiz, hipocótilo, caule e folhas da planta de feijão branco, *Phaseolus vulgaris* L., sessenta dias após o isolado ter sido inoculado na semente o que demonstra sua capacidade de colonizar diferentes tecidos vegetais (BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015).

Representantes do gênero *Isaria* foram, por mais de 30 anos, incluídos na seção *Isarioidea* do gênero de *Paecilomyces* que, posteriormente foi reconhecido como sendo polifilético. Estudos filogenéticos usando β -tubulina e rDNA (ITS) reportaram portanto, que *Isaria* é um grupo monofilético dentro da família Cordycipitaceae apresentando no seu clado as espécies *I. amoenerosea*, *I. cateniannulatus*, *I. cateniobliquus*, *I. cicadae*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea*, *I. ghanensis*, *I. javanica* e *I. tenuipes* (LUANGSA-ARD et al., 2005; SUNG et al., 2007; ZIMMERMANN, 2008). D'Alessandro et al., (2014) identificaram as espécies *I. fumosorosea*, *I. amoenerosea* e *I. tenuipes* em isolados brasileiros coletados de insetos. Este gênero tem ampla ocorrência pelo mundo infectando um número relativamente alto de hospedeiros (ZIMMERMANN, 2008). Os produtos biológicos à base de *I. fumosorosea*, com exceção do isolado PFR-97 (=ARSEF 3682) recentemente reconhecido no clado de *I. javanica*, tem como principal alvo espécies da família Aleyrodidae (Hemiptera) especialmente *B. tabaci* (FARIA; WRAIGHT, 2007; CABANILLAS et al., 2013). Diversos estudos têm revelado o uso promissor de isolados desta espécie no controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae), vetor da doença *Greening* (Huanglongbing), podendo ser utilizado como uma estratégia complementar no manejo integrado desta importante praga (AVERY et al., 2009; HOY; SINGH; ROGERS, 2010; MEYER; HOY; BOUCIAS, 2008).

O sistema de nomenclatura dupla no qual utiliza gêneros diferentes para classificar o mesmo fungo em sua fase anamórfica (por exemplo *Beauveria*) e telemórfica (*Cordyceps*) foi substituído durante o Congresso Internacional de Botânica de 2011 (Melbourne, Austrália) para um novo padrão referido como Um Fungo = Um Nome (1F = 1 N) onde será aplicado o princípio da prioridade para a

escolha do gênero que permanecerá e os outros nomes genéricos vinculados serão suprimidos (R. A. Humber, USDA-ARS, EUA, comunicação pessoal). Informações não oficiais sugerem que a partir de agora os gêneros *Beauveria* e *Isaria* passarão a ser chamados de *Cordyceps* (*Beauveria bassiana* = *Cordyceps bassiana*). *Metarhizium*, por outro lado permanecerá com este nome, conforme mencionado no item 2.4.1.

2.3 Ocorrência e abundância dos fungos entomopatogênicos no solo

Metarhizium spp., *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. são fungos onipresentes no solo do mundo inteiro, ocorrendo em ambientes sabidamente favoráveis como florestas tropicais e também em ambientes caracterizados pelas condições extremas para a sobrevivência como a Tundra Ártica e Antártica (JARONSKI, 2007). Os propágulos fúngicos quando não encontram um hospedeiro permanecem no solo por ser um ambiente estável para sua permanência (VEGA et al., 2012) entretanto, ainda não está claro se eles conseguem se proliferar no solo ou permanecem em um estado dormente aguardando um hospedeiro susceptível (MEYLING; EILENBERG, 2007). Por isso, acredita-se que esses fungos estão sujeitos a duas pressões seletivas que seria a de encontrar condições ideais no solo para sobrevivência e de ser virulento a um hospedeiro (ROBERTS; ST LEGER, 2004).

A obtenção de fungos entomopatogênicos presentes no solo pode ser realizada com métodos específicos. O método conhecido como “Insect bait”, originalmente desenvolvido para o isolamento de nematoides entomopatogênicos, foi adaptado para o isolamento de fungos e têm sido amplamente utilizado (ZIMMERMANN, 1986). A principal vantagem deste método é a recuperação de fungos biologicamente ativos e que apresentam potencial patogênico sendo recomendado a utilização de mais de um inseto hospedeiro para melhor avaliação da diversidade desses fungos no solo (VEGA et al., 2012). Este método é considerado por Jaronski (2007) como semi-quantitativo ou meramente qualitativo portanto, não é possível conhecer o nível de inóculo do fungo que está presente em determinada amostra de solo. Para se obter a densidade do inóculo utiliza-se o método onde diluições em série são feitas a partir de uma suspensão do solo e são então, plaqueadas em meios seletivos específicos (VEGA et al., 2012; INGLIS; ENKERLI; GOETTEL, 2012).

O solo de habitats naturais e agrícolas são ambientes comuns para os fungos entomopatogênicos (ST LEGER, 2008). *M. anisopliae*, quando recuperado em amostras de solo na Suíça, esteve presente em campos agrícolas ($0,02$ a $1,1 \times 10^3$ UFC g^{-1} solo) e prados adjacentes ($0,3$ a $3,6 \times 10^3$ UFC g^{-1} solo) porém, sua densidade foi 4,3 vezes maior nos prados (KELLER; KESSLER; SCHWEIZER, 2003). No Canadá, *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram recuperados em solo de 66,7% e 61,2% dos locais amostrados, respectivamente, sendo *I. farinosa* e *I. fumosorosea* encontrados em apenas 10% deles. *M. anisopliae* foi isolado com maior frequência em solo agrícola enquanto que, *B. bassiana* foi mais frequente em solo de habitat natural (BIDOCHKA; KASPERSKI; WILD, 1998). Segundo Vännien (1995), a frequência de ocorrência de *B. bassiana* (5,6%) e *I. farinosa* (0,5%) foi baixa em solo de áreas com intenso cultivo porém, isso não ocorreu com *M. anisopliae* (14,9%). Neste estudo, *B. bassiana* foi mais abundante no norte e *M. anisopliae* no sul da Finlândia.

Em um estudo realizado na China, Sun et al. (2008) definiram como áreas cultivadas aquelas cujas práticas agrícolas são intensas e com presença de cereais e milho e os habitats “naturais” foram representados por pomares. *B. bassiana* e *I. fumosorosea* (quando este último foi encontrado) foram isolados mais frequentemente a partir do solo de habitat “natural” e *M. anisopliae* parece ter sido mais frequente em solos de áreas cultivadas. Sun e Liu (2008) relacionaram a maior frequência de *B. bassiana* às regiões frias (Norte da China) e de *M. anisopliae* às regiões quentes (Sul da China) porém, nenhuma relação com o cultivo foi feita. *B. bassiana* e *I. farinosa* também ocorreram com maior frequência em campos naturais do que em áreas cultiváveis do Reino Unido enquanto que *M. anisopliae* foi raro em ambos os tipos de solos (CHANDLER; HAY; REID, 1997).

Na Espanha, *M. anisopliae* apresentou uma forte associação com solo de cultivo agrícola apesar de nenhum efeito significativo entre habitat natural e agrícola tenha sido observado para a ocorrência de *B. bassiana* (QUESADA-MORAGA et al., 2007). No estudo de Medo e Cagáň (2011), realizado na Eslováquia, *B. bassiana* e *I. farinosa* ocorreram com maior frequência em solo de floresta, *I. fumosorosea* foi mais frequentemente detectada em amostras de solo de campos com vegetação diversificada e *M. anisopliae* foi observado principalmente em áreas com cultivo de milho, batata, soja, cereais e outros, e também em áreas de pastagem. Em cultivos agrícolas do México, *M. anisopliae* também foi significativamente mais frequente

nessas áreas (SÁNCHEZ-PEÑA; LARA; MEDINA, 2011) concordando com os resultados obtidos em outros países.

Os resultados apresentados por diversos estudos têm conduzido a uma interpretação de que *M. anisopliae* é mais comum em ambientes com solo expostos e regularmente perturbados (MEYLING; EILENBERG, 2007). Diferenças na distribuição e ocorrência desses fungos, no entanto, podem ocorrer. Meyling e Eilenberg (2006) encontraram que *B. bassiana* ocorreu com maior frequência em solo de cultivo agrícola na Dinamarca, enquanto *M. anisopliae* foi raramente encontrado. No Brasil, *B. bassiana* também foi a espécie predominante no solo de cultivo de soja com $2,0 \times 10^5$ UFC g⁻¹ solo enquanto que *M. anisopliae* foi detectado nesse cultivo com uma densidade menor ($1,2 \times 10^4$ UFC g⁻¹ solo) (SOSA-GOMEZ; MOSCARDI, 1994). Em cultivo de banana essa tendência também foi observada. *B. bassiana* foi mais frequente no solo deste cultivo do que *M. anisopliae* (41 e 7%, respectivamente) atingindo altas concentrações (em média $8,2 \times 10^3$ e $4,3 \times 10^3$ UFC g⁻¹ solo, respectivamente) (LOPES et al., 2013b).

Fatores ambientais (abióticos e bióticos) influenciam de forma efetiva na ocorrência, abundância e persistência dos fungos no solo (JARONSKI, 2007). A temperatura ótima para o crescimento vegetativo dos fungos entomopatogênicos tem sido demonstrada em diversos estudos porém, deve-se considerar que os resultados podem não refletir o que ocorre no micro-habitat do solo. Em um estudo com 37 isolados de *I. fumosorosea*, Vidal, Fargues e Lacey (1997) relataram que, a temperatura ótima deste fungo foi de 20 a 30°C enquanto que, para *B. bassiana* a temperatura ótima de 65 isolados foi de 25 a 28°C embora alguns isolados exibiram crescimento ótimo em temperaturas abaixo de 20 ou acima de 30°C (FARGUES et al., 1997). No Canadá, isolados de *Metarhizium* sp. apresentaram tolerância diferente à temperatura onde aqueles coletados em solo de floresta mostraram ser capazes de crescer em baixas temperaturas (8°C) e os isolados detectados em solo agrícola suportaram temperaturas de até 37°C (BIDOCHKA et al., 2001). Isolados brasileiros de *M. anisopliae* mostraram ser tolerantes a temperatura de 40°C (RANGEL et al., 2005). *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram isolados de solo sub-antártico na Ilha Macquarie (Austrália) e alguns isolados de *M. anisopliae* geminaram a 2,5°C (RODDAM; RATH, 1997). Com estes estudos é possível observar a considerável variação que existe entre isolados do mesmo fungo ou de gêneros diferentes em resposta à temperatura.

De acordo com Jaronski (2007), a temperatura após uma certa profundidade (>2,0 cm) permanece estável devido à natureza isolante do solo sendo a umidade neste ambiente um dos fatores mais importantes atuando sobre a sobrevivência, longevidade, germinação dos conídios e conseqüentemente no crescimento e esporulação do fungo sobre o inseto. A umidade está intimamente relacionada com a textura do solo.

A classificação do solo é feita de acordo com a proporção de areia, argila e silte que definem a porosidade do solo influenciando portanto, na capacidade de retenção de água (efeito sobre a umidade do solo), transporte de solutos e difusão gasosa (TOMÉ Jr., 1997). Rath, Koen e Yip (1992) relacionando a ocorrência de *M. anisopliae* às características do solo de pastagem na Tasmânia, relataram que esta espécie foi mais frequentemente isolada em solo do tipo médio-argiloso (25 a 35% de argila) do que em solo arenoso e argiloso. Segundo os autores, a recuperação desta espécie não apresentou correlação com o pH do solo, chuva, temperatura, altitude e condutividade. *M. anisopliae*, em um estudo na Espanha, também mostrou preferência a solos com baixa ou moderada quantidade de argila (20-30%), alto conteúdo de matéria orgânica (>3%) e pH <7,0 (27,8% de ocorrência dos fungos) e 8-8,5 (38,9%). Entretanto, no mesmo estudo *B. bassiana*, foi mais frequente em solo com alta porcentagem de argila (>40%), baixo conteúdo de matéria orgânica (1-3%) e pH entre 8-8,5 (QUESADA-MORAGA et al., 2007). Na Eslováquia, a ocorrência de *B. bassiana*, foi maior em solo do tipo argiloso com alto conteúdo de matéria orgânica e pH <5,5 diferindo assim do encontrado por Quesada-Moraga et al. (2007) nos dois últimos fatores avaliados. *M. anisopliae* seguiu padrão semelhante ao relatado nos outros estudos que foi preferência por solo médio-argiloso com alto conteúdo de matéria orgânica e pH $\geq 7,5$.

A ausência de fungos entomopatogênicos no solo foi relacionada por Quesada-Moraga et al., (2007) a solos com textura arenosa, pH alcalino e baixo conteúdo de matéria orgânica. Segundo Vänninen, Husberg e Hokkanen (1989), solos arenosos são ambientes inadequados para fungos entomopatogênicos por estar propenso a rápida dessecação. Além disso, a chuva pode arrastar os conídios para camadas mais profundas reduzindo portanto, seu potencial de infectar artrópodes hospedeiros que estão na camada mais superficial do solo. Em um estudo realizado na Finlândia entretanto, o tipo de solo não influenciou na ocorrência de *B. bassiana*, *I. farinosa* e *M. anisopliae* no solo (VÄNNINEN, 1995).

Insumos e práticas agrícolas como cobertura vegetal, fertilizantes, rotações de cultura, pesticidas e sistema de plantio também apresentam grande impacto sobre a microbiota do solo influenciando significativamente na sua abundância e diversidade (JARONSKI, 2007). Klingen, Eilenberg e Meadow (2002) demonstraram que, fungos entomopatogênicos foram mais abundantes em solo de cultivo orgânico do que em cultivo convencional, onde não existe a aplicação de produtos químicos e poucos fertilizantes inorgânicos são aplicados. Pesticidas, especialmente fungicidas, podem ter efeito direto sobre a ocorrência de fungos entomopatogênicos no solo embora resultados obtidos em laboratório e condições de campo possam diferir (MIETKIEWSKI; PELL; CLARK, 1997). Jabbour e Barbercheck, (2009) entretanto, não observaram diferença significativa na ocorrência de fungos entomopatogênicos em áreas que apresentava cultivo convencional e mudou para cultivo orgânico nos três anos de avaliações. Os autores comentam ainda que, um período maior com cultivo orgânico pode vir a promover mudanças na composição e frequência desses fungos. Abundância de *M. anisopliae* também não diferiu entre solo com cultivo orgânico e convencional, após serem recuperados com *G. mellonella* na Dinamarca (MEYLING; THORUP-KRISTENSEN; EILENBERG, 2011) e na Polônia (TKACZUK et al., 2014).

Com relação ao sistema de plantio, a detecção de fungos entomopatogênicos foi significativamente maior, após três anos de monitoramento, em solo com sistemas de plantio direto comparado ao plantio convencional onde neste, a estrutura do solo é constantemente modificada causando efeito direto sobre os fungos e organismos hospedeiros (HUMMEL et al., 2002). Os resultados de Sosa-Gómez et al. (2001) mostraram que, a resposta ao tipo de cultivo pode diferir de acordo com o gênero do fungo. Não houve diferença significativa na densidade de *Beauveria* sp. (UFC g⁻¹ solo) encontrada em solo com plantio direto e convencional da soja, entretanto, alta densidade de *Metarhizium* sp. e *Isaria* sp. foi observada sob sistema de plantio direto da soja quando comparado ao convencional (SOSA-GÓMEZ et al., 2001).

Diante dos estudos mencionados, o solo representa um sistema bastante complexo por isso, relacionar a abundância e ocorrência dos fungos entomopatogênicos com os diversos fatores ambientais e o fato de cada gênero responder de forma diferente a esses fatores não tem sido uma tarefa fácil. Além

disso, diversos mecanismos sobre a vida saprofítica desses microrganismos não estão completamente entendidos.

2.4 Fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp.

2.4.1 Taxonomia: Abordagem Geral

O cientista Eli Metchnikoff (1879) descreveu pela primeira vez o fungo *Metarhizium* como patógeno de *Anisoplia austriaca* (Herbst, 1783) (Coleoptera: Scarabaeidae) uma importante praga de trigo na Rússia. Conhecido até hoje como agente causador da “muscardine verde” foi inicialmente chamado de *Entomophthora anisopliae* sendo mais tarde transferido para o gênero *Metarhizium* por Sorokin (1883) e revisado por Tulloch (1976). Metchnikoff percebeu que as larvas ficavam infectadas após o contato em solo contaminado com conídios, surgindo então as primeiras propostas para o seu uso no controle de insetos (DAVIDSON, 2012).

No início, as espécies do gênero *Metarhizium* eram definidas de acordo com seus caracteres taxonômicos dominantes, estruturas de esporulação (disposição das fiálides, tamanho e forma dos conídios que geralmente eram verdes cilíndricos ou levemente ovóides), e a coloração do micélio e do conídio apresentavam valor secundário para a taxonomia. Duas espécies foram aceitas inicialmente: *M. flavoviridae* e *M. anisopliae*. *M. anisopliae* dividida em *M. anisopliae* (Metsch.) Sorok. var. *anisopliae* por apresentar conídios menores (5-8 µm) e *M. anisopliae* (Metsch.) Sorok. var. *major* (Johnston) Tulloch com conídios maiores (10 a 14/16 µm). *M. flavoviridae* foi dividido em *M. flavoviride* Gams e Rozsypal var. *flavoviride* e *M. flavoviride* Gams e Rozsypal var. *minus* Rombach, Humber e Roberts. Duas espécies foram revisadas e adicionadas posteriormente: *M. album* Petch e *M. brunneum* Petch. Outros táxons foram propostos como *M. cylindrospora* Chen e Guo, *M. guizhouense* Chen e Guo, *M. pingshaense* Chen e Guo e *M. taii* Liang e Liu na qual sua fase telemórfica recebeu o nome de *Cordyceps taii* Liang e Liu. Apesar do esforço, a utilização desses caracteres para identificar espécies do “grupo *Metarhizium*” mostrou-se limitado à medida que tornou-se maior o número de isolados com origens geográficas e hospedeiros diferentes (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; ROMBACH; HUMBER; EVANS, 1987; ROMBACH; HUMBER; ROBERTS, 1986; TULLOCH, 1976; ZIMMERMANN, 2007b).

Para esclarecer os conflitos existentes na identificação e classificação de espécies e isolados de *Metarhizium*, dados moleculares foram acrescentados ao que previamente estava estabelecido com base nos caracteres morfológicos. Análises filogenéticas realizadas com sequências obtidas da região ITS (*Internally transcribed spacer*) revelou a existência de 10 clados distintos no mundo todo: *M. album*, *M. flavoviride* Type E, *M. flavoviride* var. *novazealandicum* Driver & Milner, var. nov., *M. flavoviride* var. *flavoviride*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. flavoviride* var. *pemphigum*, *M. anisopliae* var. *acridum* Driver & Milner, var. nov., *M. anisopliae* var. *lepidiotum* Driver & Milner, var. nov., *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus* (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000). Esses resultados foram validados por Pantou et al. (2003). Huang et al. (2005a, b), utilizando também a região ITS, colocou *M. guizhouense*, *M. pingshaense* e *M. taii* como sinônima de *M. anisopliae*. Esses estudos porém, não foram suficientes para diagnosticar algumas espécies e as afinidades filogenéticas permaneceram incertas para os diversos táxons associados com *Metarhizium*.

Estudos com multigenes ofereceram um suporte robusto e confiável para identificação das linhagens de *Metarhizium*. Inicialmente, Bischoff, Rehner e Humber (2006) determinaram que *M. frigidum* J. Bisch. et S. A. Rehner, sp. nov. pertence a uma linhagem distinta de *M. anisopliae* var. *frigidum* e *M. flavoviride* var. *flavoviride*. Mais tarde Bischoff, Rehner e Humber (2009) descreveram duas novas espécies (*M. globosum* e *M. robertsii*), três variedades foram elevadas a nível de espécie (*M. majus*, *M. lepidiotae* e *M. acridum*), o nome *M. brunneum* foi reconsiderado como espécie e *M. guizhouense* foi reconhecido como a fase anamórfica de *Metacordyceps taii*. Além disso, foram reconhecidos dois clados: PARB formado pelas espécies *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii* e *M. brunneum* e o clado MGT referido assim por representar *M. majus* e *M. guizhouense* (= *M. taii*). Os autores recomendam a região 5' do fator de alongamento da tradução (EF-1 α) para estudos rotineiros de identificação de espécies dentro de *M. anisopliae* s.l. por ser a região mais informativa.

Mudanças na nova nomenclatura para unificar o estado sexual e assexual dos fungos para 1 nome e 1 fungo (Artigo 59 do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas) transferiu o gênero *Nomuraea*, representante do clado “*Metacordyceps*” dentro da família Clavicipitaceae, para *Metarhizium*. Este por ser o nome mais antigo possui prioridade com relação aos outros possíveis nomes

da fase telemórfica de acordo com o princípio da prioridade seguido pelo código. A espécie *N. rileyi* passou a ser chamada de *M. rileyi* (Farl.) Kepler, S.A. Rehner & Humber, comb. nov. Duas novas espécies foram descritas (*M. koreanum* Kepler, S.A. Rehner & Humber, sp. nov. e *M. brasiliense* Kepler, S.A. Rehner & Humber, sp. nov.) e as variedades de *M. flavoviride* foram elevadas para espécie que inclui, *M. minus* (Rombach, Humber & D.W. Roberts) Kepler, S.A. Rehner & Humber, comb. et stat. nov., *M. novozealandicum* Kepler, S.A. Rehner & Humber, comb. et stat. nov. e *M. pemphigi* (Driver & R.J. Milner) Kepler, S.A. Rehner & Humber, comb. et stat. nov. (KEPLER et al., 2014).

No Brasil, a identificação de fungos do gênero *Metarhizium* foi recentemente realizada com base em espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) (LOPES et al., 2014). O perfil de espectro de proteínas de isolados que não se conhece a identidade foi comparado com o perfil de isolados de referência (taxonomicamente conhecidos) utilizando para isso, os conídios, que produzem uma alta qualidade e melhor reprodutibilidade do espectro de proteínas. Esta técnica permitiu recuperar com sucesso os agrupamentos taxonômicos propostos por análises genômicas (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009) apesar das distâncias e do posicionamento dos grupos apresentarem diferenças. Esta técnica além de apresentar baixo custo proporciona a identificação preliminar rápida e confiável das espécies quando os estudos envolvem uma quantia alta de isolados (LOPES et al., 2014).

Do total de nove espécies de *M. anisopliae* s.l. reconhecidas por métodos filogenéticos multigênicos (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009), sete delas foram relatadas no Brasil utilizando a região 5'-TEF, incluindo espécies do clado PARB *M. pingshaense*, *M. anisopliae* s.s., *M. robertsii* e *M. brunneum* e também, *M. lepidiotae*, *M. acridum* e *M. majus* (LOPES et al., 2013a, LOPES et al., 2013b, LOPES et al., 2014; REZENDE et al., 2015; ROCHA et al., 2013). *M. pemphigi* (= *M. flavoviride* var. *pemphigi*), *M. rileyi* e *M. brasiliense* também ocorrem no Brasil (KEPLER et al., 2014; ROCHA et al., 2013). Duas outras novas linhagens foram reconhecidas em solo brasileiro e por não terem sido caracterizadas taxonomicamente foram referidas como *Metarhizium* sp. indet. 1 (grupo irmão de *M. anisopliae*) (LOPES et al., 2014; ROCHA et al., 2013; REZENDE et al., 2015) e *Metarhizium* sp. indet. 2 designada no clado MGT (REZENDE et al., 2015).

Sequências do genoma nuclear de *M. acridum* e *M. robertsii* (GAO et al., 2011) foram utilizadas por Kepler e Rehner (2013) para o desenvolvimento de sete novos marcadores nucleares intergênicos (MzFG543igs, MzFG546igs, MzBTigs, MzIGS2, MzIGS3, MzIGS5 e MzIGS7). A análise filogenética combinada destes segmentos proporcionou uma genealogia satisfatória para *Metarhizium anisopliae* s.l. e a região MzIGS3 foi recomendada como sendo mais robusta para acessar a diversidade genética dos isolados deste complexo. Rezende et al. (2015) utilizaram dois desses marcadores intergênicos (MzFG543igs e MzIGS3) além de sequências da região 5'-TEF em um estudo sobre diversidade filogenética de isolados brasileiros de *Metarhizium* sp. obtidos de insetos e de solo. Segundo esses autores, a região intergênica MzIGS3 proporcionou um alto grau de diferenciação entre os isolados porém, foi incapaz de reproduzir a filogenia proposta por Bischoff, Rehner e Humber (2009) então, a região 5'-TEF continua sendo recomendado para este fim.

2.4.2 Importância do gênero

Metarhizium (Metsch.) Sorokin, 1883 (Ascomycota: Sordariomycetes: Hypocreales: Clavicipitaceae) é um dos gêneros de fungos entomopatogênicos mais estudados (HIBBETT et al., 2007; SUNG et al., 2007; ZIMMERMANN, 2007b). As pesquisas têm sido voltadas para três principais áreas que são (1) processo de infecção envolvendo estudos bioquímicos com enzimas relacionadas à patogenicidade e genes de virulência, (2) estrutura populacional do fungo incluindo estudos de genotipagem de isolados e a correlação dos diferentes genótipos com hospedeiro, habitat e região geográfica e (3) utilização de *Metarhizium* como agente de controle biológico com estudos voltados para produção e desenvolvimento de formulações estáveis em condições de campo (BIDOCHKA; SMALL, 2005).

As espécies deste gênero são cosmopolitas, ou seja, estão mundialmente distribuídas ocorrendo desde o ártico até os trópicos colonizando uma variedade impressionante de ambientes incluindo florestas, savanas, pântanos, zonas costeiras e desertos (ZIMMERMANN, 2007b). Desempenham um papel ecológico complexo e importante no ambiente, sendo abundantes no solo e sua associação endofítica com muitas espécies de plantas foi recentemente descoberta. A interação ocorre quando *Metarhizium* spp. infecta e mata um inseto presente no solo e o nitrogênio derivado do inseto é então translocado para a planta por meio do seu micélio que está

associado a raiz (BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012). Além de fornecer nitrogênio, sob regulação de determinados genes, *M. robertsii* adquire em troca o carbono que é exsudato da planta (FANG; ST LEGER, 2010).

O gênero consiste em um grupo diverso de fungos que apresentam duas fases: anamórfica (assexual) e telemórfica (sexual) (SUNG et al., 2007). Na fase anamórfica podem ser encontrados causando doenças em um amplo espectro de hospedeiros (mais de 200 espécies já relatadas) como é o caso de *M. anisopliae* s.l. bem como ser mais especialistas como o patógeno de gafanhotos, *M. acridum* (HAJEK; ST. LEGER, 1994). O processo de infecção é semelhante ao de outros fungos entomopatogênicos incluindo o processo de reconhecimento e adesão do conídio na cutícula do hospedeiro, penetração por meio de processos físicos e enzimáticos, colonização comprometendo o sistema de defesa do hospedeiro, reprodução e finalmente novas estruturas fúngicas, como os conídios, que emergem do corpo do hospedeiro. No processo de penetração, o fungo produz proteinases (especialmente Pr1) que tem sido principalmente estudadas nos processos de especificidade, patogenicidade e virulência desse patógeno. Quando na hemocel do hospedeiro, já no estágio final da infecção, *Metarhizium* spp. produz metabólitos secundários (dextrusina) que apresentam atividade inseticida matando o hospedeiro relativamente rápido (BIDOCHKA; SMALL, 2005). Este fungo não apresenta efeitos sobre plantas, organismos que vivem no solo e na água, predadores, parasitoides, polinizadores e vertebrados (peixes, répteis, anfíbios, pássaros, mamíferos e humanos) sendo portanto, seguros na utilização como agentes no controle biológico (ZIMMERMANN, 2007b).

O controle de insetos utilizando *Metarhizium* spp. apresenta níveis de sucesso variados e tem ultrapassado 100 anos desde a sua primeira utilização por Metchnikoff (ROBERTS; ST LEGER, 2004). Entre os 58 produtos baseados em *M. anisopliae* s.l., 63,8% (37) deles são utilizados no controle de cercopídeos e desses, 90% estão disponíveis na América do Sul e Central (FARIA; WRIGHT, 2007). O Brasil representa o programa de maior sucesso utilizando produtos comerciais e não comerciais à base de *M. anisopliae* no controle do complexo de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) incluindo *M. fimbriolata* e *M. posticata* em cana-de-açúcar e *M. fimbriolata*, *D. flavopicta* e *N. entreriana* em pastagem (ALVES et al., 2008). Esse fungo tem proporcionado níveis eficientes de controle contra cigarrinhas estimando-se que sua aplicação anual ultrapasse 2 milhões de hectares de áreas de cana-de-

açúcar (J.E.M. de Almeida, Instituto Biológico, Brasil, comunicação pessoal). O uso deste micopesticida pode aumentar devido à crescente área plantada com cana-de-açúcar no Brasil (REZENDE et al., 2015)

Metarhizium spp. também têm sido utilizados por alguns grupos de pesquisa brasileiros no controle de insetos vetores de doenças em humanos. Isolados de *M. anisopliae* s.s. mostraram ser patogênicos na fase de ovo e ninfa do percevejo *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae) vetor da doença de Chagas (LUZ; ROCHA; NERY, 2004; RODRIGUES et al., 2015). *M. pemphigi* (= *Metarhizium flavoviride* var. *pemphigi*) e *M. robertsii* também mostraram ser, pela primeira vez, patogênicos a essa espécie de inseto (ROCHA; LUZ, 2011). *M. anisopliae* apresentou atividade ovicida contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), mosquito urbano vetor do flavivirus causador da dengue e da febre amarela, quando em condições favoráveis de umidade (LUZ et al., 2007, 2008; SANTOS et al., 2009) e sobre a fase adulta desta espécie (LELES et al., 2010) e de *Anopheles gambiae* s.s. (Giles, 1926) e *An. arabiensis* (Patton, 1905) (Diptera: Culicidae) vetores da malária (MNYONE et al., 2009).

Os diversos estudos têm ressaltado o fato deste fungo ser abundante em vários tipos de habitat contribuindo assim, com a regulação natural da população de determinadas pragas bem como o seu uso potencial no desenvolvimento de produtos biológicos para o manejo de importantes pragas agrícolas e possíveis vetores de doenças. Nos últimos anos, a pressão gerada em busca de uma agricultura mais sustentável tem despertado uma maior expectativa com relação ao incentivo e investimento por parte dos órgãos governamentais (MAPA, 2014) e empresas privadas visando um maior número de registro de produtos biológicos o que reduz, conseqüentemente, o impacto causado pelo uso intensivo de produtos químicos ao meio ambiente e à saúde pública.

2.4.3 Diversidade genética

Técnicas moleculares têm sido extensamente aplicada em estudos de ecologia e virulência de fungos entomopatogênicos, especialmente *Metarhizium*, que são os mais bem estudados a nível molecular e bioquímico (ZIMMERMANN, 2007b). A ecologia molecular combina aspectos de diversas áreas de pesquisa como genética populacional e evolucionária, biodiversidade, biologia de conservação, ecologia

comportamental ou interações espécie-habitat (ENKERLI; WIDMER, 2010). Para a seleção de genótipos eficientes em programas de controle microbiano é necessário entender os fatores que modulam a ocorrência de determinado fungo, a composição da população que ocorre naturalmente no solo e como ela está estruturada em um ecossistema particular (INGLIS et al., 2008).

A diversidade genética e estrutura populacional ajuda a compreender a relação dos diferentes genótipos com o hospedeiro e/ou habitat em escala regional ou global e permite monitorar sua persistência e comportamento no ambiente que foi introduzido (ENKERLI; WIDMER, 2010). Estudos com o gênero *Metarhizium* incluem (1) isolados originados de um mesmo local ou locais próximos geograficamente (BIDOCHKA; SMALL; MICHAEL, 2005; BIDOCHKA et al., 2001; ENKERLI et al., 2005; INGLIS et al., 2008; VELÁSQUEZ et al., 2007); (2) isolados de locais distantes geograficamente (CURRAN et al., 1994; DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; ENKERLI et al., 2009; FREED; JIN; REN, 2011; LEAL et al., 1994, 1997; PIPE et al., 1995; ST. LEGER et al., 1992; TIGANO-MILANI; GOMES; SOBRAL, 1995; YANAKA-SCHAFER et al., 2008); (3) isolados originados de uma mesma espécie de hospedeiros ou de grupos de espécies semelhantes (LUAN et al., 2013) e (4) isolados de um mesmo tipo de ambiente agrícola (FEGAN et al., 1993; STEINWENDER et al., 2011, 2014).

Os métodos empregados para análise de frequência gênica em estudos de genotipagem e em alguns casos para identificação de isolados são diversos abrangendo desde os mais tradicionais até os mais modernos que incluem, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), Polimorfismo de DNA randômico (RAPD), sequências de espaçadores internos transcritos – (ITS) e sequências de regiões intergênicas não-transcritas (IGS) do gene nuclear ribossomal (rDNA), sequências do DNA mitocondrial e especialmente os microssatélites (SSR - *Simple sequence repeat*) que por serem altamente polimórficos são, atualmente, os marcadores mais adequados para genotipagem e avaliação da diversidade de espécies (ENKERLI; WIDMER, 2010).

A estrutura genética de *M. anisopliae* foi estudada por Bidochka et al. (2001) utilizando análises de polimorfismo (RAPD, RFLP e alozimas) em isolados obtidos em solo de Ontário, Canadá. Os isolados se separaram em dois grupos, geneticamente distintos e fortemente associados com dois tipos de habitat, agrícolas

e floresta. Esses dois grupos foram mais tarde identificados por Bischoff, Rehner e Humber (2009) como sendo *M. robertsii* e *M. brunneum*, respectivamente. Este estudo mudou o paradigma estabelecido na literatura onde os autores revelam que, a genética populacional deste fungo está mais relacionada com o tipo de habitat do que com a patogenicidade e o hospedeiro. Outros estudos não verificaram a associação dos genótipos com hospedeiros (LEAL et al., 1994, 1997; PIPE et al., 1995; ST. LEGER et al., 1992). A alta diversidade também foi observada entre isolados de *M. anisopliae* da Suíça, quando examinados com marcadores microssatélites, porém, a estrutura populacional do fungo dentro de regiões geográficas definidas e o habitat em específico foi ignorada (ENKERLI et al., 2005).

Inglis et al. (2008) utilizando a técnica AFLP observaram que, a diversidade genética de isolados de *M. anisopliae* coletados em solo do sudoeste de Colúmbia Britânica, Canadá, foi baixa e o mesmo genótipo foi encontrado em área agrícola, urbana e floresta porém, os fatores que levaram a isso foram incertos. O nível de polimorfismo também foi baixo entre isolados de *M. anisopliae* coletados de solo em países Asiáticos (China, Laos, Coreia do Sul, Singapore) e europeu (Holanda) quando marcadores microssatélites foram utilizados. Os autores relacionaram este fato com o tipo de marcadores utilizados, presença de diversos alelos em comum e a origem dos isolados (FREED; JIN; REN, 2011). Isolados de *M. anisopliae* coletados nas regiões Central e Sul do Chile também apresentaram baixa diversidade utilizando esse tipo de marcador. Entretanto, quando RAPD foi utilizado alta diversidade genética foi observada entre os isolados deste fungo sendo que, para ambos os métodos os autores não associaram a diversidade com a origem dos isolados (VELÁSQUEZ et al., 2007).

Isolados de *M. anisopliae* e *M. robertsii*, originados de uma importante praga da China, *Schiodtella formosana* (Hemiptera: Cydnidae), apresentaram alta diversidade genética entre as duas populações separadas por espécie e segundo os autores, a variabilidade se manteve ao longo do tempo quando os isolados foram coletados em diferentes surtos de epizootia (LUAN et al., 2013). Na Dinamarca, Steinwender et al. (2014) observaram a co-ocorrência de quatro espécies de *Metarhizium* sp. (78,8% *M. brunneum*, 14,6% *M. robertsii* e *M. majus* e *M. flavoviridae* com 3,3% cada) em solo de um único campo agrícola. *M. robertsii* exibiu uma alta diversidade molecular quando usaram marcadores microssatélites apesar de *M. brunneum* ter sido a espécie mais abundante.

A utilização de primers arbitrários PCR (AP-PCR/RAPD) foi uma das primeiras técnicas empregadas em estudos com isolados brasileiros obtidos de amostras de solo e de insetos. Neste estudo, esses isolados foram caracterizados como sendo *M. anisopliae* var. *anisopliae* (TIGANO-MILANI; GOMES; SOBRAL, 1995). Yanaka-Schäfer et al. (2008) utilizou 27 isolados provenientes de diferentes coleções de referência no Brasil. Utilizando a região IGS do gene rDNA, sugeridas por Pantou et al. (2003), os isolados demonstraram alta diversidade genética ($\pi=0,016$) e também foram identificados como *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Em ambos os estudos, não foi possível discriminar os isolados dentro do grupo taxonômico ou variedade proposta por Driver, Milner e Trueman (2000). O mesmo foi observado por Enkerli et al. (2009) quando baseado na análise de três genes de quitinase pelo método RFLP encontraram que, isolados obtidos de coleções de 12 países foram *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

Todos os métodos apresentam seus pontos fortes e fracos sendo necessário se ajustar ao tipo de pesquisa que se deseja desenvolver. Os estudos já realizados certamente adicionaram valiosas informações porém, investigações futuras ainda são necessárias para oferecer novos conhecimentos sobre questões ecológicas desconhecidas o que inclui outras espécies do complexo *M. anisopliae*, outros tipos de habitat, regiões geográficas e inclusive novas técnicas moleculares. O conhecimento gerado pode servir no futuro como base para o planejamento de novas estratégias de controle e desenvolvimentos de produtos biológicos a base de fungos.

Referências

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

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMAI, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 69-110.

AVERY, P.B.; HUNTER, W.B.; HALL, D.G.; JACKSON, M.A.; POWELL, C.A.; ROGERS, M.E. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 92, n. 4, p. 608–618, 2009.

BEHIE, S.W.; JONES, S.J.; BIDOCHKA, M.J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecology**, Manchester, v. 13, p. 112–119, 2015.

BEHIE, S.W.; ZELISKO, P.M.; BIDOCHKA, M.J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, New York, v. 336, n. 6088, p. 1576–1577, 2012.

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

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

BIDOCHKA, M.J.; SMALL, C.L. Phylogeography of *Metarhizium*, an Insect Pathogenic Fungus. In: VEGA, F.E.; BLACKWELL, M. (Ed.). **Insect - Fungal Associations: Ecology and Evolution**. New York: Oxford University Press, 2005. chap. 2, p. 28–50.

BIDOCHKA, M.; SMALL, C.L.N.; MICHAEL, S. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1361–1368, 2005.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 5, p. 737–745, 2006.

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.

CABANILLAS, H. E.; LEON, J.H.; HUMBER, R.A.; MURRAYA, K.D.; JONES, W.A. *Isaria poprawskii* sp. nov. (Hypocreales: Cordycipitaceae), a new entomopathogenic fungus from Texas affecting sweet potato whitefly. **Mycoscience**, Tokyo, v. 54, n. 2, p. 158–169, 2013.

CHANDLER, D.; HAY, D.; REID, A.P. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 133–141, 1997.

COUTINHO, L.M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 13–23, 2006.

CURRAN, J.; DRIVER, F.; BALLARD, J.W.O.; MILNER, R.J. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 5, p. 547–552, 1994.

D'ALESSANDRO, C.P.; JONES, L.R.; HUMBER, R.A.; LASTRA, C.C.L.; SOSA-GOMEZ, D.R. Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1-alpha sequences. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 54, n. S1, p. 21–31, 2014.

DAVIDSON, E.W. History of Insect Pathology. In: VEGA, F.E.; KAYA, H.K. (Ed.). **Insect Pathology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2012. chap. 2, p. 13-28.

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

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.

ENKERLI, J.; GHORMADE, V.; OULEVEY, C.; WIDMER, F. PCR-RFLP analysis of chitinase genes enables efficient genotyping of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 102, n. 2, p. 185–188, 2009.

ENKERLI, J.; WIDMER, F. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 17–37, 2010.

FANG, W.; ST LEGER, R. J. Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 154, n. 3, p. 1549–1557, 2010.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; ROUGIER, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 3, p. 383–392, 1997.

FARIA, M.R.D.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, n.3, p. 237–256, 2007.

FEGAN, M.; MANNERS, J.M.; MACLEAN, D.J.; IRWIN, J.A.G.; SAMUELS, K.D.Z.; HOLDOM, D.G.; LI, D.P. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 139, n. 9, p. 2075–2081, 1993.

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S.P.; SILVA, K.F.A.S. Micoínseticidas e Micoacaricidas no Brasil: Como estamos após quatro décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 769–779, 2009.

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, 2011.

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

HAJEK, A.E.; ST. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 39, p. 293–322, 1994.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.; HUHNDOFF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y.-C.; GAMS, W.; GEISER, D.M.; GRIFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.; KÖLJALB, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K.-H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIALIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.-M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, R.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHUESSLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M.; WINKA, K.; YAO, Y.-J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 509–547, 2007.

HOY, M.A.; SINGH, R.; ROGERS, M.E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 93, n. 1, p. 24–32, 2010.

HUANG, B.; HUMBER, R.A.; LI, S.; LI, Z.; HODGE, K.T. Further notes on the molecular taxonomy of *Metarhizium*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 94, p. 181–187, 2005a.

HUANG, B.; CHUNRU, L.; HUMBER, R.A.; HODGE, K.T.; FAN, M.; LI, Z. Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae). **Mycotaxon**, Ithaca, v. 94, p. 137–147, 2005b.

HUMMEL, R.L.; WALGENBACH, J.F.; BARBERCHECK, M.E.; KENNEDY, G.G.; HOYT, G.D.; ARELLANO, C. Effects of Production Practices on Soil-Borne Entomopathogens in Western North Carolina Vegetable Systems. **Environmental Entomology**, College Park, v. 31, n. 1, p. 84–91, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2004. **Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil**. Disponível em: <
<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>.
 Acesso em: 25 fev. 2015.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2012. **Manual técnico da vegetação brasileira**: sistema fitogeográfico, inventário das formações florestais e campestres, técnicas e manejo de coleções botânicas, procedimentos para mapeamentos. 2 ed. IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro. 275p.

INGLIS, G.D.; DUKE, G.M.; GOETTEL, M.S.; KABALUK, J.T. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, n. 1, p. 101–113, 2008.

INGLIS, G.P.; ENKERLI, J.; GOETTEL, M.S. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: LACEY, L. A. (Ed). **Manual of techniques in invertebrate pathology**. 2nd ed. London: Academic Press, 2012. chap. VII, 189-253.

JABBOUR, R.; BARBERCHECK, M.E. Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. **Biological Control**, Orlando, v. 51, n. 3, p. 435–443, 2009.

JARONSKI, S.T. Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes: A critical examination of what we (think) we know. In: EKESI, S. and MANIANIA, N. K. (Eds.). **Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management**. Kerala: Research Signpost, 2007. p. 91-144.

KELLER, S.; KESSLER, P.; SCHWEIZER, C. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. **BioControl**, Dordrecht, v. 48, n. 3, p. 307–319, 2003.

KEPLER, R.M.; HUMBER, R.A.; BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, New York, v. 106, n. 4, p. 811–829, 2014.

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.

KLINGEN, I.; EILENBERG, J.; MEADOW, R. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 91, n. 1/3, p. 191–198, 2002.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BUTT, T.M.; PEBERDY, J.F. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 9, p. 1077–1081, 1994.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BUTT, T.M.; CARDER, J.H.; BURROWS, P.R.; PEBERDY, J.F. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, n. 3, p. 257–265, 1997.

LELES, R.N.; SOUSA, N.A.; ROCHA, L.F.N.; SANTOS, A.H.; SILVA, H.H.G.; LUZ, C. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 5, p. 1271–1274, 2010.

LI, Z.; ALVES, S.B.; ROBERTS, D.W.; FAN, M.; DELALIBERA JR, I.; TANG, J.; LOPES, R.B.; FARIA, M.; RANGEL, D.E.N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 117–136, 2010.

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

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 commercial banana field and their virulence toward *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Fungal Ecology**, Manchester, v. 6, n. 5, p. 356–364, 2013b.

LOPES, R.B.; FARIA, M.; SOUZA, D.A.; BLOCH, C.; SILVA, L.P.; HUMBER, R.A. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. **Mycologia**, New York, v. 106, n. 4, p. 865–878, 2014.

LUAN, F.; ZHANG, S.; WANG, B.; HUANG, B.; LI, Z. Genetic diversity of the fungal pathogen *Metarhizium* spp., causing epizootics in Chinese burrower bugs in the Jingting Mountains, eastern China. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 40, n. 1, p. 515–523, 2013.

LUANGSA-ARD, J.J.; HYWEL-JONES, N.L.; MANOCH, L.; SAMSON, R.A. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 5, p. 581–589, 2005.

LUZ, C.; TAI, M.H.H.; SANTOS, A.H.; ROCHA, L.F.N.; ALBERNAZ, D.A.S.; SILVA, H.H.G. Ovicidal Activity of Entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) Under Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 44, n. 5, p. 799–804, 2007.

LUZ, C.; TAI, M.H.H.; SANTOS, A.H.; SILVA, H.H.G. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p. 214–215, 2008.

LUZ, C.; ROCHA, L.; NERY, G. Detection of Entomopathogenic Fungi in Peridomestic Triatomine-Infested Areas in Central Brazil and Fungal Activity Against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 783–791, 2004.

MEDO, J.; CAGÁŇ, Ľ. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, Orlando, v. 59, n. 2, p. 200–208, 2011.

MEYER, J.M.; HOY, M.A.; BOUCIAS, D.G. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 99, n. 1, p. 96–102, 2008.

MEYLING, N.V.; LÜBECK, M.; BUCKLEY, E.P.; EILENBERG, J.; REHNER, S.A. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 1282–1293, 2009.

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

MEYLING, N.V.; THORUP-KRISTENSEN, K.; EILENBERG, J. Below and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. **Biological Control**, Orlando, v. 59, n. 2, p. 180–186, 2011.

MIETKIEWSKI, R.T.; PELL, J.K.; CLARK, S.J. Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: field and laboratory comparisons. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 565–576, 1997.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Governo prioriza uso e registro de produtos biológicos**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2014/03/governo-prioriza-uso-e-registro-de-produtos-biologicos>>. Acesso em: 07 set. 2014.

Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Biomass**. 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomass>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

MNYONE, L.L.; RUSSELL, T.L.; LYIMO, I.N.; LWETOIJERA, D.W.; KIRBY, M.J.; LUZ, C. First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. and *An. arabiensis* (Diptera; Culicidae). **Parasites & Vectors**, London, v. 2, n. 1, p. 59–62, 2009.

MOTA, L.H.C.M. **Desenvolvimento de armadilha de auto-inoculação para o controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Ascomycota: Hypocreales) em tecido sintético**. 2013. 84p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PANTOU, M.P.; MAVRIDOU, A.; TYPAS, M.A. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: Excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 159–174, 2003.

PAULI, G.; LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; DAMATTO JR, E.R.; MASCARIN, G.M. Falsa broca aumenta disseminação de *Beauveria bassiana* em populações de campo da broca-do-rizoma da bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1867–1870, 2011.

PIPE, N.D.; CHANDLER, D.; BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 4, p. 485–491, 1995.

QUESADA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTÉS, J.A.; MARANHÃO, E.A.A.; ORTIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n. 8, p. 947–966, 2007.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, n. 2, p. 116–125, 2005.

RATH, A.C.; KOEN, T.B.; YIP, H.Y. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 5, p. 378–384, 1992.

REHNER, S.A.; BUCKLEY, E.A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 84–98, 2005.

REHNER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.H.; LUANGSA-ARD, J.J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, New York, v. 103, n. 5, p. 1055–1073, 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.
- RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Brasília: Embrapa, 1998. p. 89–166.
- ROBERTS, D.W.; ST LEGER, R.J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 54, p. 1–70, 2004.
- ROCHA, L.F.N.; INGLIS, P.W.; HUMBER, R.A.; KIPNIS, A.; LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, n. 3, p. 251–259, 2013.
- ROCHA, L.F.N.; LUZ, C. Activity of *Metarhizium* spp. and *Isaria* spp. from the Central Brazilian Cerrado against *Triatoma infestans* nymphs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, n. 7, p. 417–419, 2011.
- RODDAM, L.; RATH, A. Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 69, p. 285–288, 1997.
- RODRIGUES, J.; LOBO, L.S.; FERNANDES, É.K.K.; LUZ, C. Effect of formulated *Metarhizium anisopliae* on eggs and eclosing nymphs of *Triatoma infestans*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 139, p. 146–153, 2015.
- ROMBACH, M.C.; HUMBER, R.A.; EVANS, H.C. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers of rice. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 88, n. 4, p. 451–459, 1987.
- ROMBACH, M.C.; HUMBER, R.A.; ROBERTS, D.W. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 27, n. 1, p. 87–92, 1986.
- SÁNCHEZ-PEÑA, S.R.; LARA, J. S.-J.; MEDINA, R.F. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. **Journal of Insect Science**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2011.
- SANTOS, A.H.; TAI, M.H.H.; ROCHA, L.F.N.; SILVA, H.H.G.; LUZ, C. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**, Orlando, v. 50, n. 1, p. 37–42, 2009.
- SHAPIRO-ILAN, D.I.; BRUCKY, D.J.; LACEY, L.A. Principles of Epizootiology and Microbial Control. In VEGA, F.E. e KAYA, H.K. (Eds.). **Insect Pathology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2012. chap. III, 29-72.

- SOSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; MOSCARDI, F.; FARIAS, J.R.B. Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium*, *Beauveria* and *Paecilomyces* in soybean under till and no-till cultivation systems. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 407–410, 2001.
- SOSA-GOMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Effect of till and no-till soybean cultivation on dynamics of entomopathogenic fungi in the soil. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 77, n. 2, p. 284–287, 1994.
- ST LEGER, R.J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, n. 3, p. 271–276, 2008.
- ST. LEGER, R.J.; MAY, B.; ALLEE, L.L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 60, n. 1, p. 89–101, 1992.
- STEINWENDER, B.M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; MEYLING, N.V. Molecular diversity of the *Metarhizium anisopliae* lineage in an agricultural field. **International Organisation for Biological Control Bulletin**, Waedenswil, v. 66, p. 113–115, 2011.
- STEINWENDER, B.M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; THORUP-KRISTENSEN, 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.
- SUN, B.-D.; LIU, X.-Z. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 100–108, 2008.
- SUN, B.D.; YU, H.Y.; CHEN, A.J.; LIU, X.Z. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 11, p. 1421–1426, 2008.
- SUNG, G.H.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 57, p. 5–59, 2007.
- TIGANO-MILANI, M.S.; GOMES, A.C.M.M.; SOBRAL, B.W.S. Genetic variability among brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 65, n. 2, p. 206–210, 1995.
- TKACZUK, C.; KRÓL, A.; MAJCHROWSKA-SAFARYAN, A.; NICEWICZ, L. 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.
- TOMÉ Jr, J.B. Métodos Analíticos. In: _____. (Ed.). **Manual para interpretação de análise de solo**. Bento Gonçalves: Agropecuária, 1997. cap. 3, p. 59–87.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 66, n. 3, p. 407–411, 1976.

VÄNNINEN, I.; HUSBERG, G.B.; HOKKANEN, H.M.T. Occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland. **Acta Entomologica Fennica**, Helsinki, v. 53, n. 1, p. 65–71, 1989.

VÄNNINEN, I. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 93–101, 1995.

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

VEGA, F.E.; MEYLING, N. V.; LUANGSA-ARD, J. J.; BLACKWELL, M. Fungal Entomopathogens. In VEGA, F.E. e KAYA, H.K. (Eds.). **Insect Pathology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2012. chap. VI, 171-220.

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.

VIDAL, C.; FARGUES, J.; LACEY, L.A. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 70, n. 1, p. 18–26, 1997.

YANAKA-SCHÄFER, F.Y.; DALL'ONDER, L.P.; PANICHI, M.C.; MENDES, R.G.; FAGUNDES, N.J.R.; BANDINELLI, J.B.; BOGO, M.R. Sequence analysis of the rDNA intergenic spacer of *Metarhizium* strains isolated in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 116–121, 2008.

ZAPPI, D. Fitofisionomia da Caatinga associada à Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1/2, p. 34–38, 2008.

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.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 553–596, 2007a.

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

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 865–901, 2008.

3 ABUNDÂNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DA ORDEM HYPOCREALES EM SOLOS DE DIFERENTES CULTIVOS E VEGETAÇÃO NATIVA DE ÁREAS REPRESENTATIVAS DE CINCO BIOMAS BRASILEIROS

Resumo

Os fungos entomopatogênicos da Ordem Hypocreales, *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. são comumente isolados do solo onde sobrevivem de maneira saprofítica ou como endofíticos do sistema radicular das plantas. Esses fungos apresentam distribuição cosmopolita infectando uma ampla gama de artrópodes hospedeiros. O objetivo deste estudo foi comparar a abundância de fungos entomopatogênicos associados a solos de diferentes cultivos e vegetação nativa em diferentes regiões brasileiras. Coletas de solo foram realizadas em cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, em cinco estados brasileiros que representam os biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa, em duas estações (seca e úmida) nos anos de 2012 e 2013. O isolamento dos fungos foi realizado pelos métodos meio seletivo e "Insect bait" utilizando larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*. Fungos entomopatogênicos foram isolados de 86% das 1056 amostras de solo sendo *Metarhizium* o gênero predominante (presente em 66% das amostras), seguido por *Beauveria* (41,9%) e *Isaria* (10,8%). Nas amostras onde estes fungos foram detectados, a densidade variou de $0,18 \pm 0,07 \times 10^3$ a $3,46 \pm 1,52 \times 10^4$ unidades formadoras de colônias (UFC) g^{-1} de solo. Em geral, as maiores densidades de fungos entomopatogênicos foram obtidas nos biomas Amazônia (de $0,24 \pm 0,21 \times 10^3$ a $1,98 \pm 0,44 \times 10^4$ UFC g^{-1} solo) e Cerrado (de $2,27 \pm 1,58 \times 10^3$ a $3,46 \pm 1,51 \times 10^4$ UFC g^{-1} solo) e as menores densidades detectadas no bioma Caatinga (de $0,18 \pm 0,07 \times 10^3$ a $4,91 \pm 1,54 \times 10^3$ UFC g^{-1} solo). *Metarhizium* spp. foi detectado em maior número de amostras de solo em vegetação nativa e cultivos anual e perene do Cerrado. A frequência de *Isaria* spp. foi baixa nas amostras de solo, sendo detectado em maior número de amostras nos solos com cultivos anuais e vegetação nativa na Amazônia e Caatinga. *Metarhizium* spp. foi geralmente encontrado em maior número de amostras coletadas na estação úmida em comparação com as coletas da estação seca, por outro lado *Beauveria* spp. foi superior na estação seca na maioria das comparações com a estação úmida. O conhecimento da composição das populações de fungos entomopatogênicos nativos em solos brasileiros, gerado neste estudo, poderá servir como subsídio para o desenvolvimento de estratégias de conservação e maximização do controle biológico natural de pragas. Além de revelar grande número de isolados que podem ser utilizados na prospecção para desenvolvimento de biopesticidas.

Palavras-chave: *Metarhizium*; *Beauveria*; *Isaria*; densidade; Unidades formadoras de colônias; Cultivo anual; Cultivo perene; Vegetação nativa; Isolamento

Abstract

Entomopathogenic fungi of the order Hypocreales, *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. and *Isaria* spp. are commonly isolated from the soil where they survive saprofitically or as endophytes of the root system of the plants. These fungi have cosmopolitan distribution infecting a wide range of arthropod hosts. The aim of this study was to compare the abundance of entomopathogenic fungi associated with

soils of different crops and native vegetation in different Brazilian regions. Soil samples were collected in annual and perennial crops and native vegetation, in five Brazilian states that represent the biomes Amazon, Cerrado, Caatinga, Atlantic Forest and Pampa, in two seasons (wet and dry) in the years 2012 and 2013. The isolation of fungi was conducted by the methods, selective medium and "Insect bait" using larvae of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. Entomopathogenic fungi were isolated from 86% of 1,056 soil samples and *Metarhizium* (66% of the samples) was the predominant genus, followed by *Beauveria* (41.9%) and *Isaria* (10.8%). In samples where these fungi were detected, the density ranged from $0.18 \pm 0.07 \times 10^3$ to $3.46 \pm 1.52 \times 10^4$ colony-forming units (CFU) g^{-1} of soil. In general, the highest densities of entomopathogenic fungi were obtained in the Amazon (from $0.24 \pm 0.21 \times 10^3$ a $1.98 \pm 0.44 \times 10^4$ CFU g^{-1} solo) and Cerrado (from $2.27 \pm 1.58 \times 10^3$ a $3.46 \pm 1.51 \times 10^4$ CFU g^{-1} solo) biomes and the lowest densities detected in the Caatinga (from $0.18 \pm 0.07 \times 10^3$ a $4.91 \pm 1.54 \times 10^3$ CFU g^{-1} solo) biome. *Metarhizium* spp. was detected in larger numbers of soil samples of annual and perennial crops and native vegetation of Cerrado. The frequency of *Isaria* spp. was low in soil samples being detected in a greater number of soils with annual crops and native vegetation in the Amazon and Caatinga. *Metarhizium* spp. was usually found in a greater number of samples collected during the wet season compared to the collections of the dry season. On the other hand, *Beauveria* spp. was higher in the dry season in most of the comparisons with the wet season. The knowledge of the species composition of entomopathogenic fungi in Brazilian soils generated in this study may be useful for the development of conservation strategies maximizing the natural biological control of pests. In addition, it reveals a large number of isolates that can be used in prospecting for the development of biopesticides.

Keywords: *Metarhizium*; *Beauveria*, *Isaria*, Density; Colony-forming units; Annual crop; Perennial crops; Native vegetation; Isolation

3.1 Introdução

O território brasileiro na sua extensão de mais de 8,5 milhões de km^2 (IBGE, 2013) apresenta uma das maiores biodiversidades tropicais do mundo (MITTERMEIER et al., 2005) que não está somente associada ao número de espécies mas, também a diversificada formação vegetal, macroclima e outras condições ambientais, fauna e outros organismos vivos associados (COUTINHO, 2006). O bioma Amazônia ocupa a maior extensão do território nacional (49,3%) sendo uma das três grandes florestas tropicais do mundo com indicações de que abrigue pelo menos metade de todas as espécies vivas do planeta. O Cerrado está localizado principalmente no Planalto Central do Brasil sendo predominantemente composto por formações savânicas, "hotspots" mundiais de biodiversidade, com grande parte de sua extensão transformada em pasto e monocultivos. As formações florestais da Mata Atlântica se diferenciam ao longo da costa litorânea brasileira margeando desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul. Suas espécies

têm sido ameaçadas devido a drástica redução da área original. O bioma Caatinga é exclusivo no Brasil, encontrado na região Nordeste e marcante pelas condições semiáridas, irregularidade climática e baixos índices pluviométricos. O Pampa é restrito ao estado do Rio Grande do Sul ocupando 2% do território brasileiro. A vegetação predominante é de gramíneas com temperaturas amenas e chuvas regulares distribuídas ao longo do ano (IBGE, 2004; IBGE, 2012; MMA, 2015).

Os fungos entomopatogênicos da Ordem Hypocreales, especialmente *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. e *Isaria* spp., apresentam ampla distribuição geográfica ocorrendo nos trópicos e nas regiões subártica e subantártica (JARONSKI, 2007; ZIMMERMANN, 2007a, 2007b, 2008) desempenhando importantes funções ecológicas no ambiente (VEGA et al., 2012). Estes fungos são capazes de infectar um grande número de artrópodes hospedeiros (presentes no solo ou na parte aérea da planta) utilizando mecanismos especializados para degradação enzimática do tegumento conseguindo superar a defesa imunológica do hospedeiro para obtenção de nutrientes (VEGA et al., 2009). São também endofíticos em tecidos de plantas, antagonistas de patógenos de plantas, colonizadores da rizosfera, promotores de crescimento de planta e estão presentes no solo como saprófitas (MEYLING; EILENBERG, 2007; VEGA, 2008; VEGA et al., 2008, 2009).

O solo é o ambiente mais adequado para se determinar a ocorrência de fungos entomopatogênicos pois serve como um reservatório natural onde, os propágulos fúngicos que não encontraram um hospedeiro permanecem depositados neste ambiente durante parte do seu ciclo de vida (VEGA et al., 2012). A composição das espécies de fungos entomopatogênicos no solo de diferentes tipos de habitats bem como o efeito da localização geográfica, condições climáticas, características do solo, insumos e práticas agrícolas sobre a ocorrência e abundância desses fungos foi estudado em países da América do Norte (BIDOCHKA; KASPERSKI; WILD, 1998; HUMMEL et al., 2002; SÁNCHEZ-PEÑA; LARA; MEDINA, 2011), América do Sul (SOSA-GOMEZ; MOSCARDI, 1994; SOSA-GÓMEZ et al., 2001), Europa (CHANDLER; HAY; REID, 1997; KELLER; KESSLER; SCHWEIZER, 2003; KLINGEN; EILENBERG; MEADOW, 2002; MEDO; CAGÁN, 2011; MEYLING; EILENBERG, 2006; QUESADA-MORAGA et al., 2007; VÄNNINEN, 1995), Ásia (SUN et al., 2008) e Austrália (RATH; KOEN; YIP, 1992).

O ambiente do solo e os fatores bióticos e abióticos formam uma interação extremamente complexa refletindo, assim, na diferença de ocorrência, abundância e papel que os fungos *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* desempenham neste ambiente (BRUCK, 2010). No Brasil, os estudos sobre ocorrência destes fungos foram realizados abrangendo uma pequena área geográfica e restritos a um determinado tipo de habitat sendo ele natural ou cultivo agrícola, utilizando diversas espécies de insetos e meios seletivos para isolamento destes microrganismos (LOPES et al., 2013; ROCHA et al., 2009, 2013; SOSA-GOMEZ; MOSCARDI, 1994; SOSA-GÓMEZ et al., 2001). A ocorrência natural, abundância e a dinâmica destes gêneros no solo de diferentes tipos de cultivo e vegetação nativa presente nos diferentes biomas brasileiros permanece ainda desconhecida.

O presente estudo teve por objetivo comparar a abundância dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. em amostras de solo de áreas de vegetação nativa, cultivo anual e perene, em duas estações (úmida e seca), em dois anos consecutivos (2012 e 2013), de cinco áreas representativas dos biomas brasileiros Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa, utilizando o método meio seletivo e “Insect bait” com *G. mellonella* e *T. molitor* para o isolamento dos fungos. O conhecimento das populações de fungos entomopatogênicos no solo e as variações ecológicas existentes é essencial para melhorar o seu uso como agentes de controle biológico.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Amostragem do solo

As coletas foram realizadas em áreas representativas de cinco biomas brasileiros: Amazônia (Sinop-MT), Cerrado (Rio Verde-GO), Caatinga (Delmiro Gouveia-AL), Mata Atlântica (Teotônio Vilela-AL) e Pampa (Bagé-RS). Nestes cinco biomas as coletas de solo foram realizadas em áreas com vegetação nativa. O solo foi coletado também em áreas com cultivo de milho e banana na Amazônia, milho/soja e cana-de-açúcar no Cerrado e feijão e palma na Caatinga nos quais representam cultivos anuais e perenes, respectivamente (Figura 3.1). Onze áreas foram amostradas no total. As coletas foram realizadas nas estações úmida e seca dos anos de 2012 e 2013, respeitando as diferenças de estação entre os biomas.

Figura 3.1 – Biomas brasileiros, cidades e estados, tipos de cultivos agrícolas e vegetação nativa onde as coletas de solo foram realizadas

Nas áreas com cultivo anual como as coletas foram realizadas respeitando a mesma localização das unidades amostrais/repetições e pontos/fazendas nas duas estações dos dois anos, durante a estação seca na Amazônia não havia nenhum cultivo plantado devido ao vazio sanitário, na Caatinga o cultivo de feijão só esteve presente na estação seca de 2012 e nas outras coletas realizadas na mesma área não havia nada plantado e no Cerrado, as áreas apresentaram milho safrão ou milho safrinha com exceção da estação úmida de 2013 que havia cultivo de soja.

As amostragens foram realizadas em quatro pontos ou fazendas distantes pelo menos dois km entre si (Figura 3.2). Em cada ponto/fazenda foram instaladas seis unidades amostrais/repetições com dimensões de 100 x 100 cm, espaçadas cerca de 18m umas das outras. Dentro de cada unidade amostral/repetição foram feitas 10 subamostragens de solo a uma profundidade de 10 cm utilizando um amostrador cilíndrico (70 cm³) do tipo sonda (Kit Sonda S, Sonda Terra, Brasil). As dez subamostras foram misturadas dentro de sacos plásticos para formar uma amostra composta. Nas duas coletas realizadas no ano de 2012 e de 2013 procurou-se fazer as amostragens nas mesmas unidades amostrais/repetições dentro de cada ponto/fazenda.

Figura 3.2 – Delineamento utilizado para amostragem do solo

A cada troca de unidade amostral/repetição o amostrador cilíndrico foi desinfestado com água, álcool 70% e novamente água. Os sacos plásticos, devidamente identificados, contendo as amostras compostas de solo foram armazenados em caixa térmica (isopor) e transportados para o laboratório. No total, considerando as onze áreas de coleta, as duas estações (seca e úmida) e os dois anos (2012 e 2013) foram obtidas 1.056 amostras de solo, das quais 480 foram provenientes de vegetação nativa e 288 de cada um dos cultivos (anual e perene).

As unidades amostrais foram georreferenciadas utilizando GPS (Global Positioning System) e as análises físico-químicas foram realizadas pelo Instituto Brasileiro de Análises – IBRA, Sumaré/SP, Brasil (Apêndice A).

3.2.2 Isolamento de fungos entomopatogênicos

O processo de isolamento dos fungos entomopatogênicos do solo foi conduzido no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba/SP.

Dois métodos são comumente utilizados para o isolamento de fungos do solo como meio seletivo contendo fungicida e antibiótico específicos (BEILHARZ; PARBERY; SWART, 1982; CHASE; OSBORNE; FERGUSON, 1986; FERNANDES et al., 2010; RANGEL et al., 2010) e “Insect bait” com lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) e larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) (ZIMMERMANN, 1986; MEYLING; EILENBERG, 2006).

3.2.2.1 Método utilizando meio seletivo

Amostras compostas de solo foram intensamente homogeneizadas antes de serem utilizadas. Dez gramas de solo foram adicionados a tubos de vidro (Schott®) contendo 90 mL de água destilada estéril e 0,01% de espalhante adesivo (Tween 80®) (INGLIS; ENKERLI; GOETTEL, 2012). Os tubos foram mantidos por 20 minutos em uma mesa agitadora orbital (modelo: MA 140 CFT, Marconi) programada para 200 rotações por minuto (MEDO; CAGÁN, 2011). Em seguida, foram feitas três diluições em série e a partir de cada diluição uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski em uma placa de Petri (90 x 15 mm) contendo 15 mL do meio seletivo “PDAY” (batata, dextrose, ágar acrescido de 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura) com concentração de Dodine ajustada para 0,031 g L⁻¹ (RANGEL et al., 2010). O plaqueamento de cada diluição foi realizado em duplicata. As placas permaneceram abertas por alguns minutos até que o meio absorvesse a diluição, sendo então fechadas, vedadas com filme plástico de PVC (Magipack®), invertidas (com o fundo voltado para cima) e mantidas em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de 25±1°C, umidade relativa de 70±10% e fotoperíodo de 12L:12E durante 3 a 7 dias.

Todas as colônias que cresceram no meio seletivo foram contabilizadas. Os fungos foram identificados a nível de gênero considerando características microscópicas (conidióforo, hifas e conídios) e macroscópicas (aspecto e coloração das colônias) que foram comparadas com chaves taxonômicas (HUMBER, 2012). O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi obtido considerando o número de colônias presente nas duas placas, multiplicado pela diluição que a placa representava e a alíquota semeada, isso resultou no número de UFC/mL. Este valor foi então convertido em UFC g⁻¹ de solo úmido e após a obtenção da umidade das amostras o valor foi ajustado para UFC g⁻¹ de solo seco. Os resultados de UFC de fungos entomopatogênicos foram expressos para 1 g de solo seco.

Um isolado de cada gênero de fungo, presente nas placas da mesma unidade amostral, foi transferido utilizando uma alça de platina para o meio de cultura BDA (Potato Dextrose Agar, Difco™, USA) até a obtenção de colônia pura. Quando em uma mesma unidade amostral foram encontrados isolados do mesmo gênero com características morfológicas distintas, ambos foram purificados. Os isolados foram preservados em tubos criogênicos com glicerol 10% e mantidos em *freezer* -80°C na

Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba/SP.

3.2.2.2 Método utilizando “Insect bait”

Amostras compostas de solo foram intensamente homogeneizadas e peneiradas utilizando uma peneira de metal com malha de 5 mm (MEDO; CAGÁN, 2011). De cada amostra composta foram pesados 80 g gramas de solo e transferidos para potes plásticos transparentes de 140 ml deixando um espaço livre até a tampa de cerca de 2 cm para permitir ventilação. Lagartas de *G. mellonella* entre o 3º e 4º ínstar (aproximadamente quatro semanas após a eclosão), obtidas da criação em laboratório, foram preparadas de acordo com Meyling e Eilenberg (2006).

Dez lagartas desta espécie foram transferidas para cada pote contendo amostras de solo. Os potes foram armazenados em BOD a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e escotofase de 24 horas e invertidos diariamente durante a primeira semana para induzir o movimento das lagartas e aumentar a chance de contato com o fungo. O solo foi umedecido sempre que necessário. A partir do 5º dia foram realizadas as inspeções das lagartas mortas, sendo este procedimento realizado a cada dois dias por um período de três semanas. As larvas de *T. molitor* foram transferidas, em tempos diferentes, nos mesmos potes com amostras de solo utilizados para *G. mellonella*.

As lagartas/larvas mortas foram removidas, esterilizadas superficialmente em 1% de hipoclorito de sódio por 1 minuto e então imersas em água destilada estéril três vezes. Posteriormente, foram colocadas em câmara úmida e mantidos a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12L:12E por 7 dias para proporcionar a esporulação dos fungos. Após a esporulação, amostras de conídios de todas as lagartas/larvas mortas foram transferidos para o meio de cultura BDA (Potato Dextrose Agar, Difco™, USA) utilizando uma alça de platina.

A escolha do isolado para preservação foi feita com base nas características morfológicas dos fungos presentes nas placas que representavam as lagartas/larvas de uma determinada unidade amostral. Quando em uma mesma unidade amostral foram encontrados isolados do mesmo gênero com características morfológicas distintas, ambos foram purificados, se não, apenas 1 isolado foi considerado. Os fungos foram preservados em tubos criogênicos com glicerol 10% e mantidos em

freezer -80°C na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba/SP.

3.2.3 Análise estatística dos dados

Dados quantitativos obtidos com o método meio seletivo e expressos como UFC g⁻¹ solo foram considerados como dados contínuos, analisados utilizando o modelo normal tendo como pressuposições a normalidade de resíduos e homogeneidade de variâncias (AITKIN et al., 2009). Seja Y_{ij} o valor médio observado de UFC g⁻¹ para fungos (fungos entomopatogênicos e outros fungos obtidos) e UFC g⁻¹ para fungos entomopatogênicos no ecossistema i (Bioma/cultivo anual ou Bioma/cultivo perene ou Bioma/vegetação nativa) e no nível j de estação (úmida e seca). O modelo maximal ajustado para os dados contínuos foi:

$$y_{ij} = \beta_0 + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + e_{ij}, \quad i = 1, \dots, 11, \quad j = 1, 2$$

sendo β_0 a média geral, α_i o efeito do i -ésimo ecossistema, γ_j o efeito do j -ésimo nível de estação, $(\alpha\gamma)_{ij}$ o efeito da interação entre o i -ésimo nível de ecossistema com o j -ésimo nível de estação e e_{ij} o erro experimental tal que $e_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$. Esse modelo foi ajustado para os dados obtidos nos anos de 2012 e 2013, separadamente. A transformação log na variável resposta (y_{ij}) foi utilizada para obtenção da pressuposição de normalidade dos resíduos.

Os dados de presença e ausência (presença ou não de colônias) dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* no meio seletivo foram analisados como dados de proporção utilizando o modelo binomial, que é um modelo linear generalizado (NELDER; WEDDERBURN, 1972). Quando a variância foi maior do que a média, fenômeno conhecido como superdispersão, foi necessário incorporar esse efeito ao modelo para obter estimativas mais precisas com relação aos erros padrão (DEMÉTRIO et al., 2014). Quando o modelo binomial não se ajustou aos dados devido às superdispersão, o modelo quase-binomial foi ajustado onde um parâmetro adicional foi inserido na função de variância de modo que o modelo ajustasse melhor à variação extra. Seja Y_{ij} o número de amostras nas quais foi detectada a presença de cada gênero de fungo entomopatogênico no ecossistema i (Bioma/cultivo anual ou Bioma/cultivo perene ou Bioma/vegetação

nativa) e no nível j de estação (úmida e seca). Assim, o modelo maximal utilizado para esses dados foi:

$$Y_{ij} \sim \text{Binomial}(m_{ij}, \pi_{ij}),$$

com preditor linear

$$\log\left(\frac{\pi_{ij}}{1 - \pi_{ij}}\right) = \beta_0 + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij}, \quad i = 1, \dots, 11, \quad j = 1, 2,$$

sendo β_0 a média geral, α_i o efeito do i -ésimo ecossistema, γ_j o efeito do j -ésimo nível de estação e $(\alpha\gamma)_{ij}$ o efeito da interação entre o i -ésimo nível de ecossistema com o j -ésimo nível de estação. Esse modelo foi ajustado aos dados de 2012 e 2013, separadamente.

Dados de lagartas de *G. mellonella* e *T. molitor* mortas pelos fungos entomopatogênicos *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* quando o método “Insect bait” foi empregado, foram analisados como dados de proporção utilizando o modelo quase-binomial devido a superdispersão dos dados (DEMÉTRIO et al., 2014). Seja Y_{ij} o número total de lagartas mortas pelos fungos entomopatogênicos no ecossistema i (Bioma/cultivo anual ou Bioma/cultivo perene ou Bioma/vegetação nativa) e nível j de estação (úmida e seca) de um total de $m_{ij} = 240$ indivíduos e que $\pi_{ij} = \frac{Y_{ij}}{m_{ij}}$ é a proporção de lagartas mortas por fungos entomopatogênicos. Assim, o modelo maximal utilizado para esses dados foi:

$$Y_{ij} \sim \text{Binomial}(m_{ij}, \pi_{ij}),$$

com preditor linear

$$\log\left(\frac{\pi_{ij}}{1 - \pi_{ij}}\right) = \beta_0 + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij}, \quad i = 1, \dots, 11, \quad j = 1, 2,$$

sendo β_0 a média geral, α_i o efeito do i -ésimo ecossistema, γ_j o efeito do j -ésimo nível de estação e $(\alpha\gamma)_{ij}$ o efeito da interação entre o i -ésimo nível de ecossistema com o j -ésimo nível de estação. O modelo foi ajustado aos dados de 2012 e 2013, separadamente.

Os dados de lagartas de *G. mellonella* e *T. molitor* mortas pelos fungos *Metarhizium* e *Beauveria* foram analisados como dados de proporção utilizando o modelo quase-binomial devido a superdispersão dos dados (DEMÉTRIO et al., 2014). Seja Y_{ik} o número total de lagartas mortas por cada gênero de fungo

entomopatogênico no ecossistema i (Bioma/cultivo anual ou Bioma/cultivo perene ou Bioma/vegetação nativa) e no nível k de método, de um total de $m_{ik} = 240$ e que $\pi_{ik} = \frac{Y_{ik}}{m_{ik}}$ é a proporção de lagartas mortas por cada gênero de fungo entomopatogênico. Assim, o modelo maximal utilizado nesta análise foi:

$$Y_{ik} \sim \text{Binomial}(m_{ik}, \pi_{ik}),$$

com preditor linear

$$\log\left(\frac{\pi_{ij}}{1 - \pi_{ij}}\right) = \beta_0 + \alpha_i + \omega_j + (\alpha\omega)_{ij}, \quad i = 1, \dots, 11, \quad j = 1, 2$$

sendo β_0 a média geral, α_i o efeito do i -ésimo ecossistema, ω_j o efeito do j -ésimo nível de espécie e $(\alpha\omega)_{ij}$ o efeito da interação entre o i -ésimo nível de ecossistema com o j -ésimo nível de espécie. O modelo foi ajustado de acordo com a estação (seca e úmida) e ano (2012 e 2013), separadamente.

Para todas as análises realizadas, a qualidade do ajuste foi verificada por meio de gráficos meio-normais com envelope simulado (DEMÉTRIO et al., 2014). As comparações múltiplas foram realizadas utilizando testes de razão de verossimilhanças para modelos encaixados. As análises foram feitas no software R (R CORE TEAM, 2015).

3.3 Resultados

3.3.1 Isolamento de fungos entomopatogênicos das amostras de solo com meio seletivo e “Insect bait”

De um total de 1.056 amostras de solo foram preservados 2.558 isolados de fungos entomopatogênicos em 908 (86%) amostras, pelos métodos de isolamento “Insect bait” com *G. mellonella* e *T. molitor* e meio seletivo juntos (Tabela 3.1). Os fungos foram identificados inicialmente a nível de gênero, sendo *Metarhizium* o gênero predominante (obtido em 66% das amostras de solo), seguido por *Beauveria* spp. (41,9%) e *Isaria* spp. (10,8%). Apenas 4 isolados de *Lecanicillium* sp. foram recuperados pelo meio seletivo e nenhum por “Insect bait”.

Um maior número de fungos entomopatogênicos foram recuperados das amostras de solo pelo método “Insect bait” utilizando *G. mellonella* (71,3% das amostras de solo) seguido por *T. molitor* (59,6%) e meio seletivo (35,5%). A recuperação de dois fungos em uma mesma amostra foi possível em 119, 112 e 47

amostras de solo quando *G. mellonella*, *T. molitor* e meio seletivo foram utilizados, respectivamente.

Tabela 3.1 – Presença de fungos entomopatogênicos em amostras de solo de cinco biomas brasileiros revelada pelo método “Insect bait” com *Galleria mellonella* (IBG), “Insect bait” com *Tenebrio molitor* (IBT) e Meio seletivo (MS), e considerando os três métodos juntos (IBG/IBT/MS)

Gênero de fungo entomopatogênico	Método de isolamento							
	IBG		IBT		MS		IBG/IBT/MS	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Metarhizium</i> spp.	424	40,1	412	39,0	182	17,2	391	37,0
<i>Beauveria</i> spp.	204	19,3	98	9,3	76	7,2	175	16,6
<i>Isaria</i> spp.	5	0,5	8	0,7	70	6,6	19	1,8
<i>Metarhizium</i> spp. e <i>Beauveria</i> spp.	114	10,8	104	9,8	20	1,8	227	21,5
<i>Metarhizium</i> spp. e <i>Isaria</i> spp.	2	0,2	5	0,5	18	1,7	55	5,2
<i>Beauveria</i> spp. e <i>Isaria</i> spp.	3	0,3	3	0,3	9	0,8	17	1,6
<i>Metarhizium</i> spp., <i>Beauveria</i> spp. e <i>Isaria</i> spp.	1	0,1	0	0	0	0	24	2,3
Total	753	71,3	630	59,6	375	35,5	908	86,0

n = número de amostras de solo com fungo

% = valor obtido com base em um total de 1.056 amostras de solo

A recuperação de *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. em uma mesma amostra foi a mais frequentemente encontrada quando o método “Insect bait” foi utilizado. Por outro lado, utilizando o meio seletivo o número de amostras com *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. e com *Metarhizium* spp. e *Isaria* spp. foi semelhante. O número de amostras com *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. foi inferior a 1%. Em apenas uma amostra de solo, foram detectados os três gêneros de fungos quando *G. mellonella* foi utilizada. Não foi observada co-infecção por mais de um gênero de fungo entomopatogênico em uma mesma lagarta/larva. No meio seletivo, também foram observadas colônias de outros gêneros de fungos, não patogênicos a insetos, *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Purpureocillium* sp. entre outros. 225 colônias de *Trichoderma* sp. e 211 de *Purpureocillium* sp. foram incorporadas à Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba/SP.

3.3.2 Abundância de fungos entomopatogênicos com meio seletivo

Não foi constatada diferença significativa na densidade de fungos entomopatogênicos (UFC g⁻¹ de solo) para cada tipo de vegetação/bioma entre as estações seca e úmida de 2012 (Tabela 3.2). Neste ano, a densidade de fungos

entomopatogênicos na estação seca foi significativamente maior nas amostras de solo da vegetação nativa nos biomas Amazônia e Cerrado ($19,81 \pm 4,40 \times 10^3$ e $18,57 \pm 3,40 \times 10^3$, respectivamente) e na estação úmida na vegetação nativa dos biomas Amazônia ($7,70 \pm 4,47 \times 10^3$), Cerrado ($11,68 \pm 1,89 \times 10^3$) e Pampa ($10,71 \pm 8,01 \times 10^3$) e em cultivo anual (milho) na Amazônia ($8,54 \pm 3,49 \times 10^3$) e Cerrado ($11,85 \pm 4,73 \times 10^3$).

Em 2013, comparando estação seca e úmida, a densidade de fungos entomopatogênicos foi significativamente maior na estação seca no solo de vegetação nativa no Pampa e na estação úmida nos solos de vegetação nativa dos biomas Caatinga e Mata Atlântica e Pampa e em área de cultivo anual no Cerrado (Tabela 3.2). Nas comparações entre tipos de vegetação/biomas, a densidade de fungos entomopatogênicos foi significativamente maior nas três áreas amostradas na Amazônia e na vegetação nativa do Cerrado. Já na estação úmida, a densidade foi superior nos solos da área de vegetação nativa dos biomas Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica e nos cultivos anuais na Amazônia e Cerrado. Em geral, as menores densidades de fungos entomopatogênicos foram observadas nas três áreas amostradas na Caatinga nas duas estações dos dois anos.

Tabela 3.2 - Número médio de UFC g⁻¹ solo de fungos entomopatogênicos em amostras de solo coletadas em cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2012 e 2013, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Ano 2012 ^a		Ano 2013 ^a	
	Estação seca (x 10 ³)	Estação úmida (x 10 ³)	Estação seca (x 10 ³)	Estação úmida (x 10 ³)
Cultivo Banana (AMA)	3,33 ± 1,44 b	0,24 ± 0,21 d	8,41 ± 2,75 abA	3,48 ± 2,11 cA
Cultivo Milho (AMA)	4,43 ± 4,43 bc	8,54 ± 3,49 ab	10,32 ± 4,84 abA	8,83 ± 3,29 abA
Vegetação Nativa (AMA)	19,81 ± 4,40 a	7,70 ± 4,47 ab	16,32 ± 6,33 aA	18,25 ± 11,6 abA
Cultivo Feijão (CAA)	0,20 ± 0,20 d	1,04 ± 0,62 d	0,75 ± 0,58 cdA	1,17 ± 0,46 cdA
Cultivo Palma (CAA)	1,46 ± 0,37 c	0,90 ± 0,65 d	0,18 ± 0,07 dA	1,04 ± 0,62 cdA
Vegetação Nativa (CAA)	1,50 ± 0,93 cd	2,01 ± 1,00 d	0,43 ± 0,25 dB	4,91 ± 1,54 bcA
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	6,88 ± 1,70 b	4,50 ± 3,97 bcd	2,27 ± 1,58 cA	3,4 ± 1,15 bcA
Cultivo Milho (CER)	7,95 ± 2,75 b	11,85 ± 4,73 a	2,85 ± 0,32 cB	34,62 ± 15,19 aA
Vegetação Nativa (CER)	18,57 ± 3,40 a	11,68 ± 1,89 a	9,88 ± 4,96 abA	28,63 ± 12,96 abA
Vegetação Nativa (MAT)	1,69 ± 0,74 cd	3,92 ± 2,41 cd	0,97 ± 0,70 cdB	14,50 ± 5,27 aA
Vegetação Nativa (PAM)	6,70 ± 3,58 b	10,71 ± 8,01 a	5,19 ± 2,21 bcA	0,51 ± 0,51 dB

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia de UFC g⁻¹ solo de fungos entomopatogênicos obtida de 24 amostras provenientes de seis unidades amostrais/repetições e quatro pontos/fazendas dentro de cada tipo de vegetação, estação e ano ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si (p<0,05). Não foi observada diferença estatística na linha (entre estação seca e úmida) para o ano de 2012.

Nas comparações entre estação seca e úmida, a densidade de fungos entomopatogênicos e outros fungos que ocorreram nas placas com meio seletivo em 2012 foi significativamente maior em solo das três áreas amostradas na Amazônia e em cana-de-açúcar e vegetação nativa do Cerrado na estação seca. Por outro lado, na estação úmida, as densidades foram significativamente maiores em vegetação nativa dos biomas Caatinga, Mata Atlântica e Pampa (Tabela 3.3). Embora seja estações diferentes, as coletas de solo com maiores densidades de fungos foram realizadas na mesma época do ano. Em 2013, densidades significativamente maiores desses fungos foram observadas na estação seca nas amostras de solo da Amazônia, independentemente do tipo de vegetação, nos dois cultivos do Cerrado (cana-de-açúcar e milho/soja) e na vegetação nativa do Pampa. Já no solo com os cultivos de feijão e palma na Caatinga, a densidade foi maior na estação úmida.

O solo de vegetação nativa no Cerrado, na estação seca dos dois anos, apresentou a maior densidade de fungos não diferindo estatisticamente do encontrado na área de cultivo anual, também do Cerrado, no ano de 2013 (Tabela 3.3). Na estação úmida observamos que, em 2012 a densidade foi significativamente maior em áreas de vegetação nativa dos biomas Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa e em cultivo anual no Cerrado e, em 2013 nas duas áreas com cultivos do Cerrado e vegetação nativa da Mata Atlântica. No geral, novamente verificamos que as menores densidades desses fungos foram obtidas nas três áreas amostradas na Caatinga nas duas estações dos dois anos.

A porcentagem de fungos entomopatogênicos em relação ao total de fungos encontrados variou entre $2,25 \pm 2,25\%$ e $16,44 \pm 1,48\%$ e entre $0,84 \pm 0,75\%$ e $34,26 \pm 16,22\%$ na estação seca e úmida de 2012, respectivamente. Em 2013, essa variação foi entre $0,64 \pm 0,48\%$ e $11,23 \pm 3,76\%$ na estação seca e entre $1,31 \pm 1,31\%$ e $29,47 \pm 11,36\%$ na estação úmida (dados não apresentados).

Tabela 3.3 - Número médio de UFC g⁻¹ solo de fungos (fungos entomopatogênicos e outros fungos) em amostras de solo coletadas em cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2012 e 2013, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Ano 2012 ^a		Ano 2013 ^a	
	Estação seca (x 10 ⁴)	Estação úmida (x 10 ⁴)	Estação seca (x 10 ⁴)	Estação úmida (x 10 ⁴)
Cultivo Banana (AMA)	9,70 ± 1,59 cA	2,56 ± 0,51 cdB	10,16 ± 1,87 bcA	4,12 ± 1,22 bB
Cultivo Milho (AMA)	19,30 ± 4,60 bA	3,72 ± 0,18 cB	9,30 ± 1,69 bcA	3,34 ± 0,68 bB
Vegetação Nativa(AMA)	12,10 ± 2,49 cA	1,81 ± 0,58 dB	15,37 ± 2,20 bA	5,62 ± 1,67 bB
Cultivo Feijão (CAA)	1,70 ± 0,33 eA	3,89 ± 1,25 cA	1,24 ± 0,10 dB	2,05 ± 0,34 cA
Cultivo Palma (CAA)	3,00 ± 1,22 dA	5,61 ± 1,40 bA	2,07 ± 0,39 dB	4,05 ± 0,45 bA
Vegetação Nativa (CAA)	1,54 ± 0,32 eB	11,10 ± 1,09 aA	1,36 ± 0,46 dA	2,10 ± 0,54 cA
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	22,46 ± 2,5 bA	7,68 ± 3,49 bB	10,61 ± 0,58 bcA	7,96 ± 0,23 aB
Cultivo Milho (CER)	8,09 ± 0,49 cA	8,41 ± 0,69 abA	24,06 ± 6,05 aA	10,33 ± 2,66 aB
Vegetação Nativa (CER)	36,78 ± 7,32 aA	7,63 ± 0,37 abB	33,28 ± 9,04 aA	10,37 ± 1,97 bA
Vegetação Nativa (MAT)	2,80 ± 0,40 dB	10,90 ± 1,91 aA	13,18 ± 2,49 bA	10,26 ± 1,03 aA
Vegetação Nativa (PAM)	4,48 ± 0,51 dB	8,77 ± 1,67 abA	7,35 ± 1,93 cA	3,26 ± 0,26 bB

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia de UFC g⁻¹ solo de fungos entomopatogênicos obtida de 24 amostras provenientes de seis unidades amostrais/repetições e quatro pontos/fazendas dentro de cada tipo de vegetação, estação e ano ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si (p<0,05). Não foi observada diferença estatística na linha (entre estação seca e úmida) para o ano de 2012.

Quando analisamos a presença de colônias do gênero *Metarhizium* nas amostras de solo observamos que, comparando estações (seca e úmida), o solo do cultivo de banana na Amazônia e cana-de-açúcar no Cerrado apresentaram na estação seca o maior número de amostras com este fungo em 2012. Na estação úmida, foram maiores em solo de vegetação nativa na Caatinga em 2012, e nas três áreas amostradas na Caatinga e vegetação nativa no Cerrado em 2013 (Tabela 3.4).

Maiores porcentagens de amostras com *Metarhizium* spp. foram observadas, em geral, no Cerrado (Tabela 3.4). Por exemplo, $79,2 \pm 15,7\%$ das amostras de solo da vegetação nativa no Cerrado apresentaram colônias de *Metarhizium*, na estação úmida de 2013. Nas comparações entre tipos de vegetação/biomas, em 2012, a porcentagem de amostras de solo com este fungo foi significativamente maior no Cerrado, independentemente do tipo de vegetação na estação seca, e na estação úmida foi maior em solo de cultivo anual ($54,2 \pm 18,4\%$) e vegetação nativa no Cerrado ($58,3 \pm 4,8\%$) e vegetação nativa no Pampa ($33,3 \pm 15,2\%$). Em 2013 observamos algumas mudanças onde na estação seca o maior percentual de amostras de solo com *Metarhizium* spp. foi encontrado em cultivo de banana na Amazônia ($29,2 \pm 7,9\%$), cultivo anual ($29,2 \pm 7,9\%$) e vegetação nativa ($45,8 \pm 22,9\%$) no Cerrado e vegetação nativa ($25,0 \pm 10,7\%$) no Pampa. Já na estação úmida, este foi maior em cultivo anual ($54,2 \pm 19,7\%$) e vegetação nativa ($79,2 \pm 15,7\%$) no Cerrado.

Nenhuma amostra de solo obtida no bioma Caatinga, na estação seca dos dois anos, apresentou colônias deste fungo, independentemente do tipo de vegetação (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Porcentagem (%) de amostras de solo com *Metarhizium* spp. As amostras foram coletadas em cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2012 e 2013, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Ano 2012 ^a				Ano 2013 ^a			
	Estação seca		Estação úmida		Estação seca		Estação úmida	
Cultivo Banana (AMA)	16,6±0,0		0,0±0,0		29,2±7,9 abA		37,5±17,2 bA	
Cultivo Milho (AMA)	8,3±8,3 cA		16,6±6,8 bcA		12,5±7,9 bA		33,3±11,7 bA	
Vegetação Nativa(AMA)	12,5±7,9 cA		4,2±4,2 dA		16,7±9,6 bA		29,2±12,5 bcA	
Cultivo Feijão (CAA)	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		20,8±12,5 bcd	
Cultivo Palma (CAA)	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		4,2±4,2 d	
Vegetação Nativa (CAA)	0,0±0,0		8,3±8,3 cd		0,0±0,0		37,5±21,9 b	
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	41,6±4,8 aA		16,6±9,6 bcB		12,5±12,5 bA		33,3±6,8 bA	
Cultivo Milho/Soja (CER)	33,3±13,6 abA		54,2±18,4 aA		29,2±7,9 abA		54,2±19,7 abA	
Vegetação Nativa (CER)	37,5±10,4 abA		58,3±4,8 aA		45,8±22,9 aB		79,2±15,7 aA	
Vegetação Nativa (MAT)	4,2±4,2 cA		4,2±4,2 dA		0,0±0,0		41,6±19,8 b	
Vegetação Nativa (PAM)	16,6±9,6 bcA		33,3±15,2 abA		25,0±10,7 abA		8,3±8,3 cdA	

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia obtida de 24 amostras de solo (seis unidades amostrais/repetições e quatro pontos/fazendas) dentro de cada tipo de vegetação, estação e ano ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada ano, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Observando o número de amostras de solo com *Beauveria* spp., variação significativa ocorreu entre tipos de vegetação/biomas, estações e anos (Tabela 3.5). Nas comparações entre estações, em 2012 as maiores porcentagens de amostras com *Beauveria* spp. ocorreram em solo de vegetação nativa na Amazônia, cultivo de palma na Caatinga e vegetação nativa no Cerrado na estação seca enquanto que, na estação úmida *Beauveria* sp ocorreu mais em cultivo de anual na Amazônia. Em 2013, as maiores porcentagens de amostras com *Beauveria* spp. na estação seca foram nos dois cultivos na Amazônia, palma na Caatinga e vegetação nativa no Pampa e por outro lado, *Beauveria* spp. foi mais comumente encontrado na estação úmida no cultivo de anual na Caatinga, cultivo anual no Cerrado e vegetação nativa na Mata Atlântica.

Elevados percentuais de amostras com *Beauveria* spp. foram surpreendentemente encontrados na Caatinga (Tabela 3.5). Comparando tipos de vegetação/biomas observamos que, em 2012 o solo com cultivo de palma na Caatinga e vegetação nativa no Cerrado apresentaram, na estação seca, o maior número de amostras com este fungo enquanto que, na estação úmida os maiores valores foram encontrados nos solos dos dois cultivos da Amazônia, cultivo anual do Cerrado e vegetação nativa dos biomas Caatinga e Mata Atlântica. Em 2013, diferentemente a maior porcentagem de amostras com *Beauveria* spp. foi observada na estação seca nos dois cultivos da Amazônia, nas três áreas amostradas na Caatinga e na vegetação nativa no Pampa e na estação úmida apenas no cultivo anual na Caatinga.

Para o gênero *Isaria*, quando observamos entre estações, a porcentagem de amostras de solo com colônias deste fungo foi maior nas três áreas amostradas na Amazônia e vegetação nativa dos biomas Caatinga e Mata Atlântica na estação seca de 2012 e na estação úmida no cultivo anual e vegetação nativa no Cerrado (Tabela 3.6). Em 2013, *Isaria* spp. foi obtida em um maior número de amostras na estação seca em solo de vegetação nativa na Amazônia, cultivo anual na Caatinga e em cana-de-açúcar no Cerrado, e na úmida em solo de cultivo de palma e vegetação nativa na Caatinga e cultivo anual no Cerrado.

Considerando os tipos de vegetação/bioma, nos solos de vegetação nativa na Amazônia, na estação seca dos dois anos, foram encontrados maiores números de amostras com *Isaria* spp. não diferindo estatisticamente do encontrado na área de cultivo anual, também na Amazônia, no ano de 2013 (Tabela 3.6). Já na estação

úmida, este gênero esteve presente em um maior número de amostras em solo da vegetação nativa na Amazônia, de cultivo de palma na Caatinga e vegetação nativa no Cerrado em 2012 e em cultivo anual na Amazônia em 2013. Nenhuma amostra de solo obtida em vegetação nativa no Pampa apresentou colônias deste fungo.

Tabela 3.5 – Porcentagem (%) de amostras de solo com *Beauveria* spp. As amostras foram coletadas em cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2012 e 2013, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Ano 2012 ^a		Ano 2013 ^a	
	Estação seca	Estação úmida	Estação seca	Estação úmida
Cultivo Banana (AMA)	4,2±4,2 cA	8,3±4,8 abA	4,2±4,2 b	0,0±0,0
Cultivo Milho (AMA)	0,0±0,0	20,8±4,2 a	20,8±12,5 aA	4,2±4,2 cB
Vegetação Nativa(AMA)	12,5±4,2 b	0,0±0,0	16,7±6,8 aA	8,3±8,3 bcA
Cultivo Feijão (CAA)	0,0±0,0	0,0±0,0	20,8±7,9 aB	54,2±4,2 aA
Cultivo Palma (CAA)	25,0±8,3 abA	4,2±4,2 bB	20,8±10,5 a	0,0±0,0
Vegetação Nativa (CAA)	4,2±4,2 cA	8,3±4,8 abA	12,5±7,9 abA	8,3±4,8 bcA
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	0,0±0,0	0,0±0,0	4,2±4,2 bA	8,3±4,8 bcA
Cultivo Milho/Soja (CER)	12,5±12,5 bA	12,5±7,9 abA	0,0±0,0	20,8±10,4 b
Vegetação Nativa (CER)	33,3±6,8 a	0,0±0,0	4,2±4,2 bA	12,5±4,2 bA
Vegetação Nativa (MAT)	4,2±4,2 cA	8,3±4,8 abA	0,0±0,0	12,5±7,9 bc
Vegetação Nativa (PAM)	12,5±12,5 bA	4,2±4,2 bA	29,2±12,5 a	0,0±0,0

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia obtida de 24 amostras de solo (seis unidades amostrais/repetições e quatro pontos/fazendas) dentro de cada tipo de vegetação, estação e ano ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada ano, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Tabela 3.6 – Porcentagem (%) de amostras de solo com *Isaria* spp. As amostras foram coletadas em cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2012 e 2013, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Ano 2012 ^a		Ano 2013 ^a	
	Estação seca	Estação úmida	Estação seca	Estação úmida
Cultivo Banana (AMA)	12,5±7,9 b	0,0±0,0	20,8±15,7 bcA	4,2±4,2 bA
Cultivo Milho (AMA)	8,3±8,3 b	0,0±0,0	29,2±7,9 abA	37,5±15,7 aA
Vegetação Nativa(AMA)	45,8±12,5 a	16,6±0,0	54,2±12,5 a	0,0±0,0
Cultivo Feijão (CAA)	4,2±4,2 bA	12,5±7,9 abA	8,3±4,8 c	0,0±0,0
Cultivo Palma (CAA)	16,6±11,7 bA	4,2±4,2 bA	4,2±4,2 cB	12,5±7,9 bA
Vegetação Nativa (CAA)	16,6±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	12,5±7,9 b
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	0,0±0,0	0,0±0,0	12,5±7,9 bc	0,0±0,0
Cultivo Milho/Soja (CER)	0,0±0,0	4,2±4,2 b	0,0±0,0	8,3±8,3 b
Vegetação Nativa (CER)	0,0±0,0	20,8±4,2 a	8,3±4,8 cA	4,2±4,2 bA
Vegetação Nativa (MAT)	4,2±4,2 b	0,0±0,0	8,3±4,8 cA	12,5±12,5 bA
Vegetação Nativa (PAM)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia obtida de 24 amostras de solo (seis unidades amostrais/repetições e quatro pontos/fazendas) dentro de cada tipo de vegetação, estação e ano ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada ano, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

3.3.3 Ocorrência de fungos entomopatogênicos com “Insect bait”

A porcentagem de lagartas de *G. mellonella* mortas por fungos entomopatogênicos variou entre $0,0 \pm 0,0\%$ e $67,9 \pm 2,2\%$ em 2012 e entre $5,0 \pm 2,6\%$ e $70,8 \pm 2,7\%$ em 2013 (Tabela 3.7). Quando comparações entre estações foram feitas, na estação seca de 2012, a porcentagem de lagartas mortas por fungos entomopatogênicos foi maior no solo de vegetação nativa dos biomas Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica enquanto que, na estação úmida foi maior no cultivo anual na Amazônia, no cultivo de palma na Caatinga e no cultivo anual e vegetação nativa no Cerrado. Em 2013, a porcentagem de lagartas mortas foi maior nos solos com cultivo de banana e vegetação nativa na Amazônia e no cultivo de palma e vegetação nativa na Caatinga na estação seca, e no cultivo anual na Amazônia e vegetação nativa nos biomas Mata Atlântica e Pampa na estação úmida.

Comparando tipo de vegetação/bioma, na estação seca, os maiores percentuais de lagartas mortas por fungos entomopatogênicos foram observados nos solos de vegetação nativa na Caatinga em 2012 e cana-de-açúcar no Cerrado em 2013 (Tabela 3.7). Na estação úmida, a maior recuperação de fungo com *G. mellonella* foi observada no cultivo de milho na Amazônia nos dois anos, porém, os valores não diferiram do encontrado no cultivo anual e vegetação nativa no Cerrado em 2012 e cultivo de cana-de-açúcar, deste mesmo bioma, em 2013.

De um total de 10.560 lagartas de *G. mellonella* apenas 19 (0,17%) morreram por *Isaria* spp., sendo estas encontradas em solos de vegetação nativa na Mata Atlântica e nas três áreas amostradas na Caatinga (dados não apresentados).

Maiores mortalidades de *G. mellonella* por *Metarhizium* spp. foram observadas em solo de vegetação nativa na Amazônia, na estação seca dos dois anos porém, em 2013 não houve diferença estatística do encontrado no solo com cultivo de banana na Amazônia e cultivo anual no Cerrado (Tabela 3.8 e 3.9). Na estação úmida, as maiores mortalidades foram constatadas nas amostras de solo de cultivo anual ($55,4 \pm 3,5\%$) e vegetação nativa ($58,3 \pm 2,9\%$) no Cerrado em 2012 e no cultivo anual na Amazônia ($64,1 \pm 5,0\%$) e cultivo de cana-de-açúcar ($63,3 \pm 10,1\%$) no Cerrado em 2013.

As maiores porcentagens de lagartas mortas por *Beauveria* spp., na estação seca, foram encontradas nas amostras de solo de vegetação nativa na Caatinga e cana-de-açúcar no Cerrado em 2012 e 2013, respectivamente (Tabela 3.8 e 3.9).

Por outro lado, na estação úmida a recuperação deste fungo foi maior em solo com cultivo anual na Amazônia em 2012 e em vegetação nativa, desse mesmo bioma, em 2013.

Tabela 3.7 – Porcentagem (%) de lagartas de *Galleria mellonella* mortas por fungos entomopatogênicos (*Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. e *Isaria* spp.) quando colocadas em amostras de solo oriundas de cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2012 e 2013, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Ano 2012 ^a		Ano 2013 ^a	
	Estação seca	Estação úmida	Estação seca	Estação úmida
Cultivo Banana (AMA)	13,7±5,7 cdA	22,9±3,5 bA	51,2±3,7 bA	29,1±6,7 cB
Cultivo Milho (AMA)	19,6±6,8 cB	67,9±2,2 aA	35,8±5,9 cdB	68,3±3,8 aA
Vegetação Nativa(AMA)	43,7±3,9 bA	6,2±3,6 dB	50,0±3,2 bA	27,5±5,4 cB
Cultivo Feijão (CAA)	6,2±3,1 dA	12,9±0,8 cA	27,1±5,3 dA	13,7±5,8 dA
Cultivo Palma (CAA)	0,0±0,0	1,6±1,2 e	33,3±6,9 cdA	5,0±2,6 eB
Vegetação Nativa (CAA)	67,5±4,2 aA	0,4±0,4 eB	41,2±6,3 bA	17,1±5,3 dB
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	10,0±5,1 cdA	27,1±8,3 bA	70,8±2,7 aA	66,6±7,8 aA
Cultivo Milho/Soja (CER)	10,8±0,5 cB	58,7±5,0 aA	51,6±6,2 bA	40,4±7,4 bA
Vegetação Nativa (CER)	14,6±3,5 cB	58,3±2,9 aA	35,8±3,7 cA	37,5±4,9 bcA
Vegetação Nativa (MAT)	19,2±6,9 cA	5,4±0,8 dB	30,4±1,9 cdB	38,7±2,2 bA
Vegetação Nativa (PAM)	15,4±2,6 cA	20,4±4,1 bA	25,4±6,2 dB	50,0±7,9 bA

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia obtida de 240 lagartas dentro de cada tipo de vegetação, estação e ano ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada ano, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Tabela 3.8 – Porcentagem (%) de lagartas de *Galleria mellonella* mortas por *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. quando colocadas em amostras de solo oriundas de cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2012, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Estação seca		Estação úmida	
	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Beauveria</i> spp.	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Beauveria</i> spp.
Cultivo Banana (AMA)	6,6±2,1 bcA	7,1±3,8 bcA	12,1±1,6 cA	10,8±3,8 bA
Cultivo Milho (AMA)	12,1±8,0 bcA	7,5±2,2 bcA	30,8±3,2 bA	37,1±4,0 aA
Vegetação Nativa(AMA)	38,7±4,9 aA	5,0±1,3 cB	4,6±2,8 dA	1,6±1,6 deA
Cultivo Feijão (CAA)	0,0±0,0	6,2±3,2 bc	0,8±0,4 eB	10,0±1,2 bA
Cultivo Palma (CAA)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,2±1,2 de
Vegetação Nativa (CAA)	15,4±5,1 bB	48,7±9,6 aA	0,0±0,0	0,4±0,4 e
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	6,6±2,0 bcA	3,3±3,3 cA	26,6±8,6 bA	0,4±0,4 eB
Cultivo Milho/Soja (CER)	7,9±0,8 bA	2,9±1,0 cB	55,4±3,5 aA	3,3±2,3 cdB
Vegetação Nativa (CER)	11,2±3,5 bA	3,3±0,7 cB	58,3±2,9 a	0,0±0,0
Vegetação Nativa (MAT)	13,7±7,7 bcA	5,4±2,7 bcA	0,8±0,5 eB	4,6±1,0 cA
Vegetação Nativa (PAM)	3,3±1,8 cB	12,1±2,8 bA	17,9±4,1 cA	2,5±0,5 cdB
Média	10,5±3,2	9,2±2,8	18,8±2,5	6,5±1,5

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia obtida de 240 lagartas dentro de cada gênero de fungo, tipo de vegetação e estação ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada ano, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Tabela 3.9 – Porcentagem (%) de lagartas de *Galleria mellonella* mortas por *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. quando colocadas em amostras de solo oriundas de cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2013, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Estação seca		Estação úmida	
	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Beauveria</i> spp.	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Beauveria</i> spp.
Cultivo Banana (AMA)	51,2±3,7 a	0,0±0,0	25,4±5,4 cA	3,7±2,2 bB
Cultivo Milho (AMA)	30,8±8,3 bA	5,0±2,9 cB	64,1±5,0 aA	4,2±3,1 bB
Vegetação Nativa(AMA)	45,0±2,1 aA	5,0±2,9 cB	7,5±2,8 dB	20,0±2,6 aA
Cultivo Feijão (CAA)	1,2±1,2 dB	25,8±5,2 bA	5,4±4,8 dA	7,5±3,8 bA
Cultivo Palma (CAA)	4,6±3,5 cdB	28,7±4,0 bA	0,0±0,0	5,0±2,6 b
Vegetação Nativa (CAA)	6,6±1,1 cB	34,6±6,4 bA	6,6±4,4 dA	9,6±4,3 bA
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	9,6±0,8 cB	61,2±3,3 aA	63,3±10,1 aA	3,3±3,3 bB
Cultivo Milho/Soja (CER)	51,6±6,2 a	0,0±0,0	30,4±4,1 cA	10,0±3,9 bB
Vegetação Nativa (CER)	35,4±3,7 bA	0,4±0,4 dB	29,1±1,4 cA	8,3±4,1 bB
Vegetação Nativa (MAT)	0,0±0,0	30,4±2,0 b	38,3±2,3 bc	0,0±0,0
Vegetação Nativa (PAM)	25,4±6,2 b	0,0±0,0	47,1±9,0 bA	2,9±1,7 bB
Média	23,7±3,3	17,4±2,4	28,8±4,5	6,8±2,8

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia obtida de 240 lagartas dentro de cada gênero de fungo, tipo de vegetação e estação ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada ano, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

A porcentagem de larvas de *T. molitor* mortas por fungos entomopatogênicos variou entre $0,0 \pm 0,0\%$ e $68,3 \pm 9,1\%$ em 2012 e entre $0,8 \pm 0,5\%$ e $60,8 \pm 4,3\%$ em 2013 (Tabela 3.10). Nas comparações entre estações (seca e úmida) dentro de cada ano observamos que, maiores porcentagens de larvas mortas por fungos entomopatogênicos foram encontradas na estação úmida de 2012 em solos de vegetação nativa dos biomas Amazônia e Cerrado e nos dois cultivos na Caatinga. Nas demais comparações a porcentagem de lagartas infectadas entre estações foram iguais. Em 2013, a porcentagem de larvas mortas por fungos foi maior na estação seca em solos com cultivo de banana na Amazônia e vegetação nativa dos biomas Caatinga e Mata Atlântica. Por outro lado, na estação úmida foi maior em cultivo anual na Amazônia e vegetação nativa no Cerrado.

Comparações entre tipo de vegetação/biomas revelaram uma porcentagem de larvas de *T. molitor* mortas por fungos entomopatogênicos significativamente maior no solo de vegetação nativa no Pampa, na estação seca ($68,3 \pm 9,1\%$) e úmida ($67,1 \pm 5,4\%$) de 2012 (Tabela 3.10). Em 2013, a maior recuperação de fungos com *T. molitor* foi observada nos solos dos dois cultivos no Cerrado na estação seca e nos solos com cultivo anual na Amazônia e nas três áreas amostradas no Cerrado na estação úmida.

Somente 4,64% (49) das larvas de *T. molitor* morreram por *Isaria* spp., sendo estas encontradas nos solos das três áreas amostradas na Caatinga e vegetação nativa no Pampa (dados não apresentados).

Mortalidades significativamente maiores de larvas de *T. molitor* mortas por *Metarhizium* spp. foram observadas, na estação seca, em solos de vegetação nativa no Pampa e em cultivo anual no Cerrado em 2012 e 2013, respectivamente (Tabela 3.11 e 3.12). Na estação úmida, os maiores percentuais de mortalidade por este fungo foram constatados nas amostras de solo de vegetação nativa dos biomas Cerrado e Pampa em 2012 e nos cultivos anuais na Amazônia e Cerrado e em vegetação nativa no Cerrado em 2013.

As maiores porcentagens de larvas mortas de *T. molitor* por *Beauveria* spp. na estação seca de 2012 foram observadas em solos com cultivo de banana na Amazônia e vegetação nativa no Pampa enquanto que, na estação úmida a recuperação deste fungo foi maior em solo de vegetação nativa no Pampa (Tabela 3.11). Em 2013, os maiores percentuais de larvas mortas por *Beauveria* spp. foram constatados, na estação seca, nos solos com cultivo de palma na Caatinga, cultivo

de cana-de-açúcar no Cerrado e em vegetação nativa na Mata Atlântica (Tabela 3.12). Na estação úmida, as porcentagens de mortalidade foram significativamente maiores nos solos de vegetação nativa dos biomas Amazônia e Cerrado.

Comparando porcentagens de lagartas de *G. mellonella* mortas por *Metarhizium* spp. com as porcentagens de lagartas mortas por *Beauveria* spp. verificamos que, em 20 (45,4%) comparações a mortalidade causada pelo fungo *Metarhizium* foi maior, em 14 (31,8%) comparações *Beauveria* foi o fungo que causou a maior mortalidade e em 11 comparações não houve diferença estatística na recuperação de ambos os fungos por *G. mellonella*. Já com *T. molitor*, *Metarhizium* spp. infectou um maior número de larvas em 25 (56,8%) comparações enquanto que, em apenas 7 (15,9%) comparações *Beauveria* foi o fungo que causou o maior percentual de larvas mortas. Não houve diferença estatística na recuperação de ambos os fungos por esta espécie em 12 comparações.

A média geral da porcentagem de lagartas/larvas mortas por cada gênero de fungo em cada estação e ano indicou que, houve uma maior recuperação de *Metarhizium* spp. na estação úmida em relação a estação seca tanto para *G. mellonella* quanto para *T. molitor*. Já para *Beauveria* spp., a recuperação foi maior na estação seca em relação a estação úmida com ambas as espécies de insetos, com exceção de *T. molitor* que em 2012 a média geral da porcentagem de larvas mortas por *Beauveria* spp. foi semelhante nas duas estações.

Tabela 3.10 – Porcentagem (%) de larvas de *Tenebrio molitor* mortas por fungos entomopatogênicos (*Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. e *Isaria* spp.) quando colocadas em amostras de solo oriundas de cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2012 e 2013, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Ano 2012 ^a		Ano 2013 ^a	
	Estação seca	Estação úmida	Estação seca	Estação úmida
Cultivo Banana (AMA)	31,2±6,3 bA	27,5±4,4 cdA	28,3±1,5 cdA	8,7±4,1 dB
Cultivo Milho (AMA)	4,2±2,6 dA	13,3±5,5 deA	17,9±4,4 eB	45,8±11,9 abA
Vegetação Nativa(AMA)	4,6±1,8 dB	17,9±2,4 dA	23,3±5,1 deA	25,0±6,1 cA
Cultivo Feijão (CAA)	0,0±0,0	27,9±9,0 cd	0,8±0,5 fA	0,8±0,8 eA
Cultivo Palma (CAA)	0,0±0,0	5,0±3,9 ef	35,4±7,7 bcdA	0,8±0,8 eA
Vegetação Nativa (CAA)	10,8±1,4 cA	17,5±4,2 dA	35,0±4,6 bcA	3,7±3,7 dB
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	21,2±4,2 bcA	20,8±5,2 dA	59,2±4,3 aA	44,2±5,3 abA
Cultivo Milho/Soja (CER)	30,4±7,2 bA	37,5±6,6 bcA	55,8±2,6 aA	60,8±4,3 aA
Vegetação Nativa (CER)	13,7±4,5 cB	49,2±4,3 bA	42,5±1,6 bB	52,1±2,5 aA
Vegetação Nativa (MAT)	4,58±3,5 dA	2,1±1,6 fA	40,8±4,5 bA	20,4±6,9 cB
Vegetação Nativa (PAM)	68,3±9,1 aA	67,1±5,4 aA	36,7±11,5 bcdA	33,3±11,7 bcA

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia obtida de 240 larvas dentro de cada tipo de vegetação, estação e ano ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada ano, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Tabela 3.11 – Porcentagem (%) de larvas de *Tenebrio molitor* mortas por *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. quando colocadas em amostras de solo oriundas de cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2012, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Estação seca		Estação úmida	
	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Beauveria</i> spp.	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Beauveria</i> spp.
Cultivo Banana (AMA)	6,6±2,6 cB	24,6±7,9 aA	15,4±1,0 cdA	12,1±4,4 bA
Cultivo Milho (AMA)	0,0±0,0	4,2±2,6 b	9,1±5,8 deA	4,1±2,0 cA
Vegetação Nativa(AMA)	2,9±1,4 dA	1,6±0,9 bA	15,0±1,5 cdA	2,9±1,0 cB
Cultivo Feijão (CAA)	0,0±0,0	0,0±0,0	7,1±1,8 eA	3,7±2,4 cA
Cultivo Palma (CAA)	0,0±0,0	0,0±0,0	1,2±0,8 fA	3,3±3,3 cA
Vegetação Nativa (CAA)	4,6±2,1 cdA	5,4±2,1 bA	5,4±3,3 efA	11,6±1,2 bA
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	20,8±4,0 bA	0,4±0,4 bB	20,8±5,2 c	0,0±0,0
Cultivo Milho/Soja (CER)	29,2±8,2 bA	1,2±1,2 bB	37,5±6,6 b	0,0±0,0
Vegetação Nativa (CER)	8,7±3,2 cA	5,0±4,4 bA	49,2±4,3 a	0,0±0,0
Vegetação Nativa (MAT)	4,6±3,5 cd	0,0±0,0	0,8±0,8 fA	1,2±0,8 cA
Vegetação Nativa (PAM)	50,4±3,9 aA	17,9±11,3 aB	42,9±4,8 abA	24,1±5,2 aB
Média	11,6±2,6	5,5±2,8	18,6±3,2	5,7±1,8

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia obtida de 240 larvas dentro de cada gênero de fungo, tipo de vegetação e estação ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada ano, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Tabela 3.12 – Porcentagem (%) de larvas de *Tenebrio molitor* mortas por *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. quando colocadas em amostras de solo oriundas de cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, nas estações seca e úmida de 2013, de cinco biomas brasileiros

Tipo de Vegetação*	Estação seca		Estação úmida	
	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Beauveria</i> spp.	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Beauveria</i> spp.
Cultivo Banana (AMA)	27,9±1,2 cA	0,4±0,4 cB	8,7±4,1 de	0,0±0,0
Cultivo Milho (AMA)	16,6±3,9 dA	1,2±1,2 cB	45,0±11,4 abA	0,8±0,8 bB
Vegetação Nativa(AMA)	22,5±4,8 cdA	0,8±0,4 cB	13,3±3,9 dA	11,6±2,9 aA
Cultivo Feijão (CAA)	0,0±0,0	0,8±0,4 c	0,8±0,8 f	0,0±0,0
Cultivo Palma (CAA)	1,6±1,6 eB	32,5±8,5 aA	0,0±0,0	0,8±0,8 b
Vegetação Nativa (CAA)	26,6±4,1 cA	8,3±2,4 bB	3,7±3,7 ef	0,0±0,0
Cultivo Cana-de-açúcar (CER)	22,5±5,2 cdB	36,6±1,2 aA	43,3±6,0 bA	0,8±0,8 bB
Cultivo Milho/Soja (CER)	55,8±2,6 a	0,0±0,0	59,6±4,4 aA	1,2±0,8 bB
Vegetação Nativa (CER)	42,1±1,2 bA	0,4±0,4 cB	45,0±3,2 abA	7,1±2,4 aB
Vegetação Nativa (MAT)	0,4±0,4 eB	40,4±4,9 aA	20,4±6,9 cd	0,0±0,0
Vegetação Nativa (PAM)	34,1±10,6 bcA	2,1±0,8 cB	33,3±11,7 bc	0,0±0,0
Média	22,7±3,2	11,2±1,8	24,8±5,1	2,0±0,7

* Biomas brasileiros: Amazônia (AMA), Caatinga (CAA), Cerrado (CER), Mata Atlântica (MAT), Pampa (PAM)

^aMédia obtida de 240 larvas dentro de cada gênero de fungo, tipo de vegetação e estação ± Erro Padrão da média seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada ano, não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

3.4 Discussão

Este é o primeiro estudo comparativo da abundância de fungos entomopatogênicos associados a solos de vegetação nativa e cultivos anuais e perenes em áreas representativas de cinco biomas brasileiros. O conhecimento da composição das populações de fungos entomopatogênicos nativos em solo brasileiro é um importante subsídio para o desenvolvimento de estratégias para conservação das populações destes patógenos no solo e maximização do controle biológico natural de pragas.

Neste estudo, fungos entomopatogênicos foram detectados em 86% das amostras de solo através de dois métodos de isolamento utilizados, que foram “Insect bait” com *G. mellonella* e *T. molitor* e meio seletivo. Em regiões temperadas, quando meio seletivo e *G. mellonella* foram utilizados, 83% das amostras de solo apresentaram fungos entomopatogênicos na Eslováquia (MEDO; CAGÁŇ, 2011) e 96% na Suíça (KELLER; KESSLER; SCHWEIZER, 2003). Quando somente *G. mellonella* foi utilizado, os fungos entomopatogênicos foram detectados em 71,7% das amostras de solo na Espanha (QUESADA-MORAGA et al., 2007), 53,8% na China (SUN; LIU, 2008), 38,6% na Finlândia (VÄNNINEN, 1995), 20,5% na Turquia (SEVIM et al., 2010) e 15,8% no Reino Unido (CHANDLER; HAY; REID, 1997). Desta forma, observa-se que a porcentagem de amostras de solo com fungo entomopatogênico varia em função da região geográfica, tipo de vegetação nos solos amostrados e métodos de isolamento. Os resultados deste estudo indicam que os métodos de amostragens usados são complementares aumentando a chance de isolamento destes fungos.

Metarhizium foi o gênero predominante nas amostras de solo neste estudo e também nos estudos realizados na Turquia (SEVIM et al., 2010), Polônia (TKACZUK et al., 2014), Noruega (KLINGEN; EILENBERG; MEADOW, 2002), Suíça (KELLER; KESSLER; SCHWEIZER, 2003), Tasmânia (RATH; KOEN; YIP, 1992), Canadá (BIDOCHKA; KASPERSKI; WILD, 1998) e Ilha subantártica (RODDAM; RATH, 1997). No Brasil, este gênero não foi o mais encontrado em solos de cultivos de banana (LOPES et al., 2013) e soja (SOSA-GOMEZ; MOSCARDI, 1994) onde *B. bassiana* foi o mais abundante, entretanto, essas análises se restringem a um único local e tipo de cultivo.

Metarhizium, *Beauveria* e *Isaria*, foram os entomopatógenos mais abundantes encontrados nos solos de diferentes cultivos e áreas de vegetação nativa neste estudo. Estes fungos também relatados ocorrendo em solos na América do Sul (ROCHA et al., 2009; SOSA-GÓMEZ et al., 2001), América do Norte (JABBOUR; BARBERCHECK, 2009; SÁNCHEZ-PEÑA; LARA; MEDINA, 2011), Europa (CHANDLER; HAY; REID, 1997; MEDO; CAGÁN, 2011; QUESADA-MORAGA et al., 2007; TKACZUK et al., 2014; VÄNNINEN, 1995) e Ásia (SUN; LIU, 2008), confirmando assim, a distribuição cosmopolita desses fungos.

A densidade média de fungos entomopatogênicos encontrada foi de $7,09 \times 10^3$ (variando entre $0,18 \pm 0,07 \times 10^3$ e $34,62 \pm 15,19 \times 10^3$ UFC g⁻¹ solo). Keller, Kessler e Schweizer (2003) reportaram que a densidade máxima de fungos entomopatogênicos obtida em diferentes áreas de cultivos foi de $6,7 \times 10^3$ UFC g⁻¹ solo. Tkaczuk et al. (2014) quando estudaram a composição de fungos entomopatogênicos em solos de cultivo orgânico e convencional relataram que a densidade encontrada foi de $5,8 \times 10^3$ e $5,3 \times 10^3$, respectivamente. Apesar da variação entre os meios seletivos, tipos de vegetação e regiões geográficas amostradas observamos que a densidade de fungos entomopatogênicos neste estudo foi semelhante ao obtido por outros autores.

O solo representa um ambiente bastante complexo onde a abundância dos fungos entomopatogênicos está intimamente relacionada a diversos fatores (JARONSKI, 2007). Elevadas densidades de fungos entomopatogênicos foram comumente encontradas em solo dos biomas Amazônia e Cerrado, especialmente nas áreas com vegetação nativa. Alguns autores relataram a preferência de fungos entomopatogênicos aos solos argilosos com alto conteúdo de matéria orgânica, que são as características encontradas nas áreas dos biomas Amazônia e Cerrado (MEDO; CAGÁN, 2011; QUESADA-MORAGA et al., 2007). Solos argilosos apresentam uma tendência de reter mais água tornando o ambiente úmido e propício para o desenvolvimento dos fungos. A maior capacidade de troca de cátions em solos com maior conteúdo de matéria orgânica, pode resultar em uma maior adsorção dos conídios dos fungos ou pode levar a um aumento na densidade de artrópodes hospedeiros onde os fungos podem se multiplicar (INGLIS et al., 2001). Outros estudos verificaram que a comunidade de bactérias também foram abundantes nesses biomas (ARAUJO et al., 2012; MENDES et al., 2015; RAMPELOTTO et al., 2013), confirmando o potencial apresentado por essas áreas.

O bioma Caatinga, por outro lado, apresentou no geral, as menores densidades de fungos entomopatogênicos nas áreas amostradas. Os solos deste bioma são caracterizados pelo alto conteúdo de areia, pH de 5,2 e 5,7 e baixo teor de matéria orgânica. Quesada-Moraga et al., (2007) associaram a baixa ocorrência de fungos entomopatogênicos a solos com textura arenosa, pH alcalino e baixo conteúdo de matéria orgânica, na Espanha. Segundo Vänninen, Husberg e Hokkanen (1989), solos arenosos são ambientes propensos a rápida dessecação e além disso, a chuva pode arrastar propágulos fúngicos, como os conídios, para camadas mais profundas do solo que pode ter levado às baixas densidades de inóculo fúngico constatado neste estudo. Entretanto, apesar da densidade de fungos entomopatogênicos ter sido baixa observamos que a porcentagem de amostras com *Beauveria* e *Isaria* foi alta nas áreas com cultivo anual e perene e vegetação nativa do bioma Caatinga.

Poucos estudos relacionam a interação direta entre os fungos entomopatogênicos e os membros específicos da microbiota do solo (JARONSKI, 2007). Densidades elevadas de outros fungos nas amostras de solo podem inibir o crescimento de fungos entomopatogênicos no meio seletivo. Em um estudo de laboratório, *B. bassiana* e *M. anisopliae* tiveram seu crescimento inibido pelos fungos saprofíticos *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Pullularia* sp., *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. (WALSTAD; ANDERSON; STAMBAUGH, 1970). Entretanto, em nossas análises não foi possível demonstrar uma relação entre as densidades populacionais de outros fungos e dos fungos entomopatogênicos.

Mesmo com a grande variabilidade dos dados obtidos nos dois anos observamos que *Metarhizium* prevaleceu nas amostras de solo de cultivos anual e perene e vegetação nativa no bioma Cerrado. Em outros países, *Metarhizium* spp. têm sido detectado em maior frequência em solos de áreas de cultivos do que de vegetação nativa (BIDOCHKA; KASPERSKI; WILD, 1998; HUMMEL et al., 2002; MEDO; CAGÁÑ, 2011; QUESADA-MORAGA et al., 2007; SÁNCHEZ-PEÑA; LARA; MEDINA, 2011; SUN et al., 2008; VÄNNINEN, 1995) sugerindo que este fungo é mais comum em solos expostos e perturbados regularmente (MEYLING; EILENBERG, 2007), mas os fatores que influenciam nessa preferência por solos agrícolas ainda não foram determinados. Aparentemente, nos solos brasileiros onde estudos já foram realizados este fungo não parece seguir esta tendência. Em outro

estudo realizado em áreas que também compreendem o bioma Cerrado, *Metarhizium* foi o mais detectado, ocorrendo em 22% das amostras coletadas em vegetações nativas (ROCHA et al., 2013).

Não se observou uma maior associação de *Beauveria* spp. a uma determinada vegetação ou bioma, sendo elevadas porcentagens de amostras com esse fungo encontradas em vários cultivos e vegetação nativa incluindo áreas do bioma Caatinga. A ocorrência de *Beauveria* sp. tem sido mais associada a solos argilosos, com alta porcentagem de argila (>40%), baixo conteúdo de matéria orgânica e pH entre 8-8,5 (QUESADA-MORAGA et al., 2007) ou a solos com alto conteúdo de matéria orgânica e pH <5,5 (MEDO; CAGÁN, 2011). Entretanto, neste estudo *Beauveria* sp. foi encontrada em solos com características que variam de argilosos a arenosos, com alto e baixo teor de matéria orgânica e pH entre 4,0 a 5,7 demonstrando assim, a versatilidade ecológica desses fungos. Alguns estudos relataram maior abundância de *Beauveria* sp. em vegetação nativa (BIDOCHKA; KASPERSKI; WILD, 1998; MEDO; CAGÁN, 2011; QUESADA-MORAGA et al., 2007; SUN et al., 2008; VÄNNINEN, 1995) enquanto outros, a solos agrícolas (MEYLING; EILENBERG, 2006; SOSA-GOMEZ; MOSCARDI, 1994).

O número de amostras com fungo *Isaria* spp. foi baixa nas diversas áreas deste estudo. Este fungo também foi relatado ocorrendo com baixa frequência em solos de regiões temperadas (CHANDLER; HAY; REID, 1997; MEDO; CAGÁN, 2011; SÁNCHEZ-PEÑA; LARA; MEDINA, 2011; SEVIM et al., 2010; VÄNNINEN, 1995) porém, na China foi o fungo com o maior número de isolados recuperados no solo (SUN; LIU, 2008). A maior detecção deste gênero foi comumente obtida nos solos com cultivos anuais e vegetação nativa na Amazônia com o meio seletivo e com "Insect bait" o maior número de lagartas/larvas mortas foi obtido nos cultivos anuais e vegetação nativa na Caatinga. Em um estudo realizado na Eslováquia, *I. fumosorosea* foi detectada ocorrendo com maior frequência em solos com maior conteúdo de areia e *I. farinosa* em solos com maior conteúdo de argila (MEDO; CAGÁN, 2011). Neste estudo ainda, os autores relataram a preferência de *I. farinosa* por áreas de floresta e *I. fumosorosea* por áreas com pastagem e cultivos agrícolas. Desta forma, o fato deste gênero ter sido encontrado em áreas de cultivo e vegetação nativa pode ter uma relação intrínseca com a composição das espécies nesses ambientes sendo necessário portanto, mais investigações.

Além das características relacionadas ao solo outros fatores também podem ter influenciado na variação encontrada na densidade e recuperação dos fungos entomopatogênicos no solo dos dois anos, como por exemplo o tipo de adubação, pesticidas, práticas agrícolas, sistema de cultivo usados durante as coletas e nos anos anteriores. Esses fatores, segundo Jaronski (2007), apresentam grande impacto sobre a microbiota do solo influenciando significativamente na sua densidade. Klingen, Eilenberg e Meadow (2002) relataram que fungos entomopatogênicos foram mais abundantes em solo com cultivo orgânico onde não existe a aplicação de produtos químicos e poucos fertilizantes inorgânicos são aplicados do que em cultivo convencional. Com relação ao sistema de cultivo, a detecção de fungos entomopatogênicos foi significativamente maior em solo com sistemas de plantio direto comparado ao plantio convencional onde a estrutura do solo é constantemente modificada (HUMMEL et al., 2002). De acordo com Sosa-Gómez et al. (2001) a densidade de *Beauveria* sp. não diferiu em solo com plantio direto e convencional da soja, entretanto, altas densidades de *Metarhizium* sp. e *Isaria* sp. foram observadas sob sistema de plantio direto, concluindo com isso que a resposta ao tipo de cultivo também pode diferir de acordo com o gênero do fungo.

Nas comparações entre estação seca e úmida observamos que, em geral a detecção de fungos entomopatogênicos nas amostras de solo e a recuperação deles por meio de *G. mellonella* e *T. molitor* foi semelhante nas duas estações estudadas entretanto, quando as diferenças foram constatadas observamos que *Metarhizium* spp. foi mais detectado na estação úmida e *Beauveria* spp. na estação seca. Nas situações onde não foram constatadas diferenças entre estações seca e úmida, isso pode estar relacionado ao fato de que no nosso estudo, as coletas de solo foram realizadas a uma profundidade de 0-10 cm onde provavelmente a temperatura se manteve estável devido a natureza isolante do solo (JARONSKI, 2007) e de acordo com as características dos solos estudados a umidade pode ter sido mantida proporcionando a sobrevivência e igual recuperação dos fungos. Além disso, os fungos entomopatogênicos são capazes de resistir a temperaturas elevadas e variáveis bem como a condições de alta umidade e de *stress* ocasionado pela seca, nos solos (INGLIS et al., 2001).

A detecção de fungos entomopatogênicos com o método “Insect bait” foi maior do que com meio seletivo. Keller, Kessler e Schweizer (2003) e Inglis et al. (2008) também relataram que “Insect bait” foi mais efetivo na recuperação de fungos

entomopatogênicos do solo do que meio seletivo. Meios seletivos são utilizados com o sentido de explorar a habilidade saprofítica dos fungos entomopatogênicos bem como determinar a densidade do inóculo presente na amostra enquanto que, a utilização de insetos suscetíveis recupera fungos biologicamente ativos e que apresentam potencial patogênico (INGLIS; ENKERLI; GOETTEL, 2012). No método utilizando meio seletivo, a detecção dos fungos entomopatogênicos pode ser influenciada por compostos fungistáticos liberados por outros fungos e que inibem o crescimento dos entomopatógenos (WALSTAD; ANDERSON; STAMBAUGH, 1970) ou pelo tipo de meio e concentrações do fungicida utilizado (RANGEL et al., 2010). As espécies de insetos utilizadas no “Insect bait” apresentam susceptibilidades diferentes (ODDSDOTTIR et al., 2010) onde no presente estudo, *T. molitor* recuperou mais *Metarhizium* spp. do que *Beauveria* spp. enquanto que, com *G. mellonella* além dessa diferença não ter sido marcante foi também a espécie que recuperou fungos de um maior número de amostras. Com isso, sugere-se que esta espécie seja utilizada quando se objetiva recuperar ambos gêneros de fungos do solo.

Diante do apresentado neste estudo observamos que, a abundância de fungos entomopatogênicos no solo pode ser influenciada por diversos fatores, bióticos ou abióticos, e cada gênero pode responder de forma diferente a esses fatores sendo portanto, difícil fazer relações diretas. Áreas que apresentaram altas densidades de fungos entomopatogênicos nos anos de coleta como por exemplo, a Amazônia e o Cerrado e até mesmo na Caatinga onde verificamos que porcentagens elevadas de amostras e insetos mortos com *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. foram detectadas sugerem que, estratégias de manejo sejam adotadas para conservação desses inimigos naturais que participam na regulação natural de populações de insetos edáficos. Além disso, os isolados obtidos neste estudo poderão ser utilizados em estudos de bioprospecção para desenvolvimento de biopesticidas para o controle biológico de pragas.

Referências

AITKIN, M.; FRANCIS, B.; HINDE, J.; DARNELL, R. **Statistical modelling in R**. Oxford: Oxford University Press, 2009. 576p.

ARAUJO, J.F.; de CASTRO, A.P.; COSTA, M.M.C.; TOGAWA, R.C.; PAPPAS JÚNIOR, G.J.; QUIRINO, B.F.; BUSTAMANTE, M.M.C.; WILLIAMSON, L.; HANDELSMAN, J.; KRÜGER, R.H. Characterization of soil bacterial assemblies in brazilian savanna-like vegetation reveals acidobacteria dominance. **Microbial Ecology**, New York, v. 64, n. 3, p. 760–770, 2012.

BEILHARZ, V.; PARBERY, D.; SWART, H. Dodine: a selective agent for certain soil fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 79, n. 3, p. 507–511, 1982.

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

BRUCK, D.J. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 103–112, 2010.

CHANDLER, D.; HAY, D.; REID, A.P. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 133–141, 1997.

CHASE, A.; OSBORNE, L.; FERGUSON, V. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 69, n. 2, p. 285–292, 1986.

COUTINHO, L.M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 13–23, 2006.

DEMÉTRIO, C.G.B.; HINDE, J.; MORAL, R.A. Models for overdispersed data in entomology. In: FERREIRA, C.P.; GODOY, W.A.C. (Ed.) **Ecological Modelling Applied to Entomology**, New York: Springer, 2014. chap. 9, 219-259.

FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.N.; FOSTER, N.R.; ROBERTS, D.W. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, Orlando, v. 54, n. 3, p. 197–205, 2010.

HUMBER, R.A. Identification of entomopathogenic fungi. In: LACEY, L.A. (Ed.) **Manual of techniques in invertebrate pathology**. London: Academic Press, 2012. chap. VI, 151-187.

HUMMEL, R.L.; WALGENBACH, J.F.; BARBERCHECK, M.E.; KENNEDY, G.G.; HOYT, G.D.; ARELLANO, C. Effects of Production Practices on Soil-Borne Entomopathogens in Western North Carolina Vegetable Systems. **Environmental Entomology**, College Park, v. 31, n. 1, p. 84–91, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2004. **Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira**: sistema fitogeográfico, inventário das formações florestais e campestres, técnicas e manejo de coleções botânicas, procedimentos para mapeamentos. 2. ed. Rio de Janeiro, 2012. 275 p.

_____. **Área territorial brasileira**. 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_territ_area.shtm>. Acesso em: 23 fev. 2015.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of Hyphomycetous fungi for managing insects pest. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.W.; MAGAN, N. (Eds.). **Fungi as biocontrol agents**: Progress, Problems and Potential. Wallingford: CAB, 2001. chap. 3, p. 23-70.

INGLIS, G.D.; DUKE, G.M.; GOETTEL, M.S.; KABALUK, J.T. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, n. 1, p. 101–113, 2008.

INGLIS, G.P.; ENKERLI, J.; GOETTEL, M.S. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: LACEY, L.A. (Ed). **Manual of techniques in invertebrate pathology**. London: Academic Press, 2012. chap. VII, 189-253.

JABBOUR, R.; BARBERCHECK, M.E. Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. **Biological Control**, Orlando, v. 51, n. 3, p. 435–443, 2009.

JARONSKI, S.T. Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes: A critical examination of what we (think) we know. In: EKESI, S.; MANIANIA, N.K. (Ed.). **Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management**. Kerala: Research Signpost, 2007. p. 91-144.

KELLER, S.; KESSLER, P.; SCHWEIZER, C. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. **BioControl**, Dordrecht, v. 48, n. 3, p. 307–319, 2003.

KLINGEN, I.; EILENBERG, J.; MEADOW, R. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 91, n. 1/3, p. 191–198, 2002.

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 commercial banana field and their virulence toward *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Fungal Ecology**, Manchester, v. 6, n. 5, p. 356–364, 2013.

MEDO, J.; CAGÁŇ, Ľ. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, Orlando, v. 59, n. 2, p. 200–208, 2011.

MENDES, L.W.; TSAI, S.M.; NAVARRETE, A.A.; DE HOLLANDER, M.; VEEN, J.A. van; KURAMAE, E.E. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, New York, 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.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 43, n. 2, p. 145–155, 2007.

Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Biomass**. 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomass>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

MITTERMEIER, R.A.; da FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. A Brief History of Biodiversity Conservation in Brazil. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 601–607, 2005.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, Series A, Oxford, v.135, n.3, p.370–384, 1972.

ODDSDOTTIR, E.S.; NIELSEN, C.; SEN, R.; HARDING, S.; EILENBERG, J.; HALLDORSSON, G. Distribution patterns of soil entomopathogenic and birch symbiotic ectomycorrhizal fungi across native woodland and degraded habitats in Iceland. **Icelandic Agricultural Sciences**, Iceland, v. 23, p. 37–49, 2010.

QUESADA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTÉS, J.A.; MARANHÃO, E.A.A.; ORTIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n. 8, p. 947–966, 2007.

R Core Team, 2015. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>, Acesso em: 1 Abr. 2015.

RAMPELOTTO, P.H.; FERREIRA, A.S.; BARBOZA, A.D.M.; ROESCH, L.F.W. Changes in Diversity, Abundance, and Structure of Soil Bacterial Communities in Brazilian Savanna Under Different Land Use Systems. **Microbial Ecology**, New York, v. 66, n. 3, p. 593–607, 2013.

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.

RATH, A.C.; KOEN, T.B.; YIP, H.Y. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 5, p. 378–384, 1992.

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.

ROCHA, L.F.N.; INGLIS, P.W.; HUMBER, R.A.; KIPNIS, A.; LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, n. 3, p. 251–259, 2013.

RODDAM, L.; RATH, A. Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 69, p. 285–288, 1997.

SÁNCHEZ-PEÑA, S.R.; LARA, J. S.J.; MEDINA, R.F. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. **Journal of Insect Science**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2011.

SEVIM, A.; DEMIR, I.; HÖFTE, M.; HUMBER, R.A.; DEMIRBAG, Z. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 279–297, 2010.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; MOSCARDI, F.; FARIAS, J.R.B. Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium*, *Beauveria* and *Paecilomyces* in soybean under till and no-till cultivation systems. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 407–410, 2001.

SOSA-GOMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Effect of till and no-till soybean cultivation on dynamics of entomopathogenic fungi in the soil. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 77, n. 2, p. 284–287, 1994.

SUN, B.D.; YU, H.Y.; CHEN, A.J.; LIU, X.Z. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 11, p. 1421–1426, 2008.

SUN, B.-D.; LIU, X.-Z. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 100–108, 2008.

TKACZUK, C.; KRÓL, A.; MAJCHROWSKA-SAFARYAN, A.; NICEWICZ, L. 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.

VÄNNINEN, I.; HUSBERG, G.B.; HOKKANEN, H.M.T. Occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland. **Acta Entomologica Fennica**, Helsinki, v. 53, n. 1, p. 65–71, 1989.

VÄNNINEN, I. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 93–101, 1995.

VEGA, F.E.; POSADA, F.; AIME, M.C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S.A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, Orlando, v. 46, n. 1, p. 72–82, 2008.

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

VEGA, F.E.; GOETTEL, M.S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M.A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N.K.; MONZÓN, A.; OWNLEY, B.H.; PELL, J.K.; RANGEL, D.E.N.; ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, Manchester, v. 2, n. 4, p. 149–159, 2009.

VEGA, F.E.; MEYLING, N. V.; LUANGSA-ARD, J.J.; BLACKWELL, M. Fungal Entomopathogens. In VEGA, F.E.; KAYA, H.K. (Ed.). **Insect Pathology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2012. chap. VI, 171–220.

WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; STAMBAUGH, W.J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 16, n. 2, p. 221–226, 1970.

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.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 553–596, 2007a.

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

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 865–901, 2008.

Apêndice

Apêndice A – Coordenadas geográficas e propriedades físico-químicas das amostras de solo obtidas nos cultivos anuais, perenes e vegetação nativa de áreas representativas de cinco biomas brasileiros

Bioma	Vegetação	Coordenada geográfica*		pH ^a	MO ^b	CTC ^c	Granulometria (g/kg)		
		Latitude (S)	Longitude (W)		g/dm ³	mmol _c /dm ³	Areia	Silte	Argila
Amazônia (Sinop-MT)	Banana	11 56'2,51"	55 29'0,43"	5,2	58	108,3	319	135	546
	Milho	11 51'7,28"	55 22'6,25"	5,5	47	81,0	379	121	500
	Vegetação Nativa	11 52'3,95"	55 23'8,76"	4,0	57	144,7	284	141	575
Caatinga (Delmiro Gouveia-AL)	Palma	9 25'51,8"	37 57'36,2"	5,7	31	79,8	730	139	131
	Feijão	9 26'3,89"	37 57'1,26"	5,7	25	68,7	734	133	133
	Vegetação Nativa	9 24'1,40"	37 58'2,40"	5,2	33	77,6	717	150	133
Cerrado (Rio Verde-GO)	Cana-de-açúcar	17 26'14,2"	51 38'10,3"	5,5	42	67,0	319	109	572
	Milho/Soja	17 30'37,5"	51 14'16,9"	5,4	46	98,3	200	176	624
	Vegetação Nativa	17 29'48,4"	51 13'40,9"	4,4	67	117,5	339	155	506
Mata Atlântica (Teotônio Vilela-AL)	Vegetação Nativa	9 51'7,42"	36 20'3,06"	4,3	50	110,3	525	104	371
Pampa (Bagé-RS)	Vegetação Nativa	31 41'53,4"	54 13'39,3"	4,4	56	220,2	219	364	417

*Locais de coleta de solo indicado pelas coordenadas geográficas

^apH em CaCl₂

^bMatéria Orgânica (M.O.)

^cCapacidade de Troca de Cátions (C.T.C. Total)

4 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Metarhizium* spp. ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLO DE DIFERENTES CULTIVOS E VEGETAÇÃO NATIVA DE ÁREAS REPRESENTATIVAS DE CINCO BIOMAS BRASILEIROS

Resumo

O gênero *Metarhizium* consiste de um grupo diverso de fungos que ocorrem naturalmente no solo e associados a rizosfera de plantas. *M. anisopliae* é o principal fungo entomopatogênico utilizado para o controle de pragas no Brasil. Informações sobre a composição de espécies deste grupo de patógenos, bem como sua diversidade, distribuição e associação com diferentes tipos de cultivos e áreas de vegetação nativa são escassas no país. Sequências de DNA obtidas da região intergênica MzIGS3 de 303 isolados foram utilizadas para caracterizar a diversidade genética em função do bioma (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa), vegetação (nativa, cultivo anual e perene), estação (úmida e seca), ano (2012 e 2013) e método de isolamento (meio seletivo e inseto utilizado como isca). As espécies foram identificadas por meio do sequenciamento da região 5'-TEF (fator de alongamento da tradução 1 alfa). A diversidade de isolados de *Metarhizium* spp. provenientes de áreas de vegetação nativa foi maior do que aqueles obtidos de cultivos anuais e perenes. Seis linhagens foram encontradas neste estudo: *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. pingshaense*, *Metarhizium* sp. indet. 1, *Metarhizium* sp. indet. 2 e *Metarhizium* sp. indet. 3. Somente na Amazônia foram encontrados haplótipos de todas estas linhagens. *M. robertsii* compreendeu 65% dos isolados e foi encontrado em todos os cultivos e áreas com vegetação nativa dos cinco biomas. *Metarhizium* sp. indet. 1 foi a segunda linhagem mais abundante (12,5%) e apresentou a maior diversidade haplotípica dentre as linhagens estudadas. Uma nova linhagem, não caracterizada taxonomicamente, *Metarhizium* sp. indet. 3, foi encontrada predominantemente na Caatinga. Nas comparações entre cultivos, os isolados provenientes de solo de cana-de-açúcar apresentaram a menor diversidade nucleotídica. O conhecimento gerado sobre a filogenia, diversidade e distribuição dos haplótipos de *Metarhizium* spp. em solo poderá servir de subsídio para maximização do seu uso como agente de controle biológico.

Palavras-chave: Fungo entomopatogênico; Diversidade haplotípica; Diversidade nucleotídica; Região intergênica MzIGS3; Filogenia; Identificação

Abstract

The genus *Metarhizium* consists of a diverse group of fungi that occur naturally in the soil and are associated with the rhizosphere of plants. *M. anisopliae* is the leading entomopathogenic fungus used for pest control in Brazil. Information on species composition of this group of pathogens, as well as its diversity, distribution and association with different types of crops and areas with native vegetation are scarce in the country. DNA sequences of the intergenic region MzIGS3 from 303 isolates were used to characterize the genetic diversity in terms of the biome (Amazon, Cerrado, Atlantic Forest, Pampa and Caatinga), vegetation (native, annual and perennial crops), season (wet and dry), year (2012 and 2013) and isolation method (selective medium and "Insect bait"). The species were identified through the sequencing of the 5'-TEF (translation elongation factor 1-alpha). The diversity of isolates of *Metarhizium* spp. from areas of native vegetation was greater than that

obtained from annual and perennial crops. Six lineages were found in this study: *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. pingshaense* and three indetermined species. Only in the Amazon, all these lineages were found. *M. robertsii* comprised 65% of isolates and was found in all crops and areas with native vegetations of the five biomes. *Metarhizium* sp. indet. 1 was the second most abundant lineage (12.5%) and showed the greatest haplotype diversity among the lineages studied. A new lineages, not characterized taxonomically, *Metarhizium* sp. indet. 3, was found predominantly in Caatinga. In comparisons among crops, the isolates from sugarcane soils showed the lowest nucleotide diversity. The knowledge generated about phylogeny, diversity and distribution of *Metarhizium* spp. haplotypes in the soil may be useful for maximizing its use as biological control agent.

Keywords: Entomopatogenic fungi; Haplotype diversity; Nucleotide diversity; Intergenic region MzIGS3; Phylogeny; Identification

4.1 Introdução

O gênero *Metarhizium* (Metsch.) Sorokin consiste de um grupo diverso de fungos que pertencem à família Clavicipitaceae e apresentam as fases anamórfica (assexual) e telemórfica (sexual) (SUNG et al., 2007). Desempenham importantes funções ecológicas no ambiente (CHRISTENSEN, 1989), ocorrendo naturalmente no solo, incluindo a rizosfera, e causam doenças em artrópodes hospedeiros de diferentes ordens (HAJEK; ST. LEGER, 1994). Com distribuição cosmopolita tem sido isolado de regiões temperadas, tropicais, semiáridas quente e em áreas árticas (RODDAM; RATH, 1997). No Brasil, tem sido utilizado para o controle de cercopídeos em áreas de cana-de-açúcar e pastagens (ALVES et al., 2008) e estudado para controle de insetos vetores de doenças em humanos como *Triatoma infestans* (LUZ; ROCHA; NERY, 2004; ROCHA; LUZ, 2011), *Aedes aegypti* (LUZ et al., 2007, 2008; SANTOS et al., 2009; LELES et al., 2010), *Anopheles gambiae* s.s. e *An. Arabiensis* (MNYONE et al., 2009).

Metarhizium foi o gênero predominante no capítulo 3 desta tese, ocorrendo em 697 (66%) das amostras de solo coletadas em cinco áreas representativas dos biomas brasileiros. De acordo com Meyling; Thorup-Kristensen, Eilenberg (2011) esse gênero é predominantemente encontrado no solo onde apresentam adaptações particulares, ainda não totalmente entendidas, para sobrevivência neste ambiente (MEYLING; EILENBERG, 2007). A espécie *M. anisopliae*, tradicionalmente utilizada no controle biológico de espécies, foi recentemente classificada como um complexo composto por nove espécies em um estudo baseado na análise de multilocos com suporte na morfologia (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009). A

composição e dominância destas espécies no solo tem variado de acordo com pesquisas realizadas na América do Sul (LOPES et al., 2014; REZENDE et al., 2015; ROCHA et al., 2013), América do Norte (FISHER; REHNER; BRUCK, 2011; KEPLER et al., 2015; WYREBEK et al., 2011), Europa (STEINWENDER et al., 2011, 2014) e Ásia (NISHI et al., 2011).

Sete espécies do complexo foram relatadas no Brasil, incluindo espécies do clado PARB que são *M. pingshaense*, *M. anisopliae* s.s., *M. robertsii* e *M. brunneum* e também, *M. lepidiotae*, *M. acridum*, *M. majus* (LOPES et al., 2013a, LOPES et al., 2013b, LOPES et al., 2014; REZENDE et al., 2015; ROCHA et al., 2013). Duas outras novas linhagens foram reconhecidas em solo brasileiro, e por não terem sido caracterizadas taxonomicamente foram referidas como *Metarhizium* sp. indet. 1 (grupo irmão de *M. anisopliae*) (LOPES et al., 2014; ROCHA et al., 2013; REZENDE et al., 2015) e *Metarhizium* sp. indet. 2 designada no clado MGT (REZENDE et al., 2015). As espécies *M. pemphigi* (= *M. flavoviride* var. *pemphigi*), *M. rileyi* (Farl.) Kepler, S.A. Rehner & Humber, comb. nov. e *M. brasiliense* Kepler, S.A. Rehner & Humber, sp. nov. (KEPLER et al., 2014; ROCHA et al., 2013) também ocorrem no Brasil porém, não estão associadas ao complexo *M. anisopliae* s.l.

A diversidade genética e estrutura populacional de *M. anisopliae* s.l. tem sido bastante explorada na última década para compreender a correlação dos diferentes genótipos com o hospedeiro e/ou habitat em escala regional ou global e além disso, para seu monitoramento no ambiente (ENKERLI; WIDMER, 2010). Para obter informações sobre frequências gênicas vários marcadores foram desenvolvidos como RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), RAPD (Polimorfismo de DNA randômico), sequências do gene nuclear ribossomal (rDNA) e microssatélites foram os mais utilizados por serem altamente polimórficos (BIDOCHKA; SMALL; MICHAEL, 2005; BIDOCHKA et al., 1994, 2001; DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; ENKERLI et al., 2005, 2009; FEGAN et al., 1993; INGLIS et al., 2008; LEAL et al., 1994; LUAN et al., 2013; PIPE et al., 1995; STEINWENDER et al., 2011, 2014; VELÁSQUEZ et al., 2007). No Brasil, tais estudos se restringem a isolados que se encontram depositados em coleções de entomopatógenos ou que foram coletados em um determinado tipo de habitat/hospedeiro associado a uma região ou estado, como é o caso do Centro-Oeste brasileiro (LOPES et al., 2013a, 2013b; LOPES et al., 2014; REZENDE et al.,

2015; ROCHA et al., 2013; SOSA-GÓMEZ et al., 2009; TIGANO-MILANI; GOMEZ; SOBRAL, 1995; YANAKA-SCHAFER et al., 2008).

Considerado um dos países mais ricos em biodiversidade do mundo (MITTERMEIER et al., 2005) o Brasil é representado pelos biomas que são áreas do espaço geográfico definidas por seu macroclima e fitofisionomia e quando associado aos organismos vivos e outras condições ambientais possuem ecologia própria (COUTINHO, 2006). O bioma Amazônia apresenta a maior floresta tropical do mundo sendo considerada a maior reserva de diversidade biológica. Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro com dois milhões de km² e um dos “hotspots” mundiais de biodiversidade e nos últimos anos tem sido transformado em pasto e monocultivos. Mata Atlântica se estende continuamente desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul e apresenta apenas 8% da sua cobertura vegetal original formada por florestas, restingas, manguezais e campos de altitude. A Caatinga, predominante no nordeste brasileiro, apresenta vegetação tipicamente seca e espinhosa devido à falta de chuvas durante grande parte do ano. Pampa está restrito a região Sul, ocupa apenas 2% do território, com predominância de campos nativos utilizados para pecuária (IBGE, 2004; MMA, 2015).

Além da identificação das espécies de *Metarhizium* que ocorrem nesses biomas, outras informações sobre sua diversidade, distribuição e associação com cultivos agrícolas e vegetação nativa em estação de seca e úmida nessas áreas, foram pouco exploradas ou permanecem desconhecidas. Motivados a responder algumas dessas questões propusemos um estudo baseado em análises de diversidade genética utilizando sequências de DNA obtidas da região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3 (KEPLER; REHNER, 2013) de 303 isolados coletados no estudo descrito no capítulo anterior. O objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade genética de isolados e espécies de *Metarhizium* sp. coletados no solo em função do bioma (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa), ano (2012 e 2013), estação (úmida e seca), método de isolamento (meio seletivo e inseto utilizado como isca) e vegetação (nativa, cultivo anual e perene). Essas informações nos auxiliará a compreender como os diferentes haplótipos de *Metarhizium* sp. estão distribuídos e relacionados aos diversos tipos de vegetação em cinco áreas brasileiras, além de somar com o que se conhece sobre filogenia no Brasil e no mundo.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Origem dos isolados

Os isolados de *Metarhizium* sp. foram obtidos de amostras de solo coletadas em áreas representativas de cinco biomas brasileiros: Amazônia (Sinop-MT), Cerrado (Rio Verde-GO), Caatinga (Delmiro Gouveia-AL), Mata Atlântica (Teotônio Vilela-AL) e Pampa (Bagé-RS). Nestes cinco biomas as coletas de solo foram realizadas em áreas com vegetação nativa. O solo foi também coletado em áreas com cultivo de milho e banana na Amazônia, milho/soja e cana-de-açúcar no Cerrado e feijão e palma na Caatinga nos quais representam cultivos anuais e perenes, respectivamente. Onze áreas foram amostradas no total. As coletas foram realizadas nas estações úmida e seca dos anos de 2012 e 2013, respeitando as diferenças de estação entre os biomas.

O acesso à coleta do material utilizado em nossa pesquisa foi garantido pelos produtores das diferentes fazendas. As amostragens foram realizadas em quatro pontos ou fazendas distantes pelo menos dois km. Em cada ponto foram instaladas seis unidades amostrais/repetições com dimensões de 100 cm x 100 cm, espaçadas cerca de 18 m umas das outras. Dentro de cada unidade amostral/repetição foram feitas 10 subamostragens de solo a uma profundidade de 10 cm utilizando um amostrador cilíndrico do tipo sonda (70 cm³). As dez subamostras foram misturadas em sacos plásticos para formar uma amostra composta. No total, considerando as onze áreas de coleta, as duas estações (seca e úmida) e os dois anos (2012 e 2013) foram obtidas 1.056 amostras de solo, onde 480 foram provenientes de vegetação nativa e 288 de cada um dos cultivos (anual e perene).

No Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, *Metarhizium* spp. foi recuperado do solo utilizando os métodos meio seletivo e “Insect bait”. Os meios seletivos utilizados foram “PDAY” (RANGEL et al., 2010) e “CTC-1T” (FERNANDES et al., 2010) que diferem no fungicida e antibiótico utilizado. Dez gramas da amostra composta de solo foram suspensos em 90 mL de água destilada estéril com 0,01% de espalhante adesivo (Tween 80®) e agitadas por 20 minutos a 200 rpm. Cada suspensão foi diluída em três séries, 100 µL espalhado no meio de cultura e as placas foram então, incubadas por 7 dias a 25±2°C e 12h de fotofase. O meio “CTC-

1T” foi utilizado para o isolamento de *M. acridum* uma vez que esta espécie se mostrou susceptível ao fungicida Dodine utilizado no meio “PDAY” (RANGEL et al., 2010). Apenas as suspensões das amostras compostas provenientes da primeira unidade amostral de cada ponto/fazenda foram inoculadas neste meio. No método “Insect bait” dez lagartas/larvas (3-4º instar) de *G. mellonella* e *T. molitor*, criadas em laboratório, foram colocadas em potes plásticos transparentes (140 ml) contendo 80 g da amostra composta de solo, seguindo metodologia adaptada de Meyling e Eilenberg (2006) e Zimmermann (1986). Os potes que foram incubados a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e escotofase. A inspeção dos insetos mortos foi realizada a cada dois dias durante 21 dias e quando encontrados foram superficialmente esterilizados e mantidos em câmara úmida por 7 dias para confirmação da mortalidade pelo fungo entomopatogênico.

As colônias do fungo *Metarhizium* sp. encontradas foram purificadas em meio Difco® e preservados em tubos criogênicos com glicerol 10%. Os isolados estão mantidos em freezer -80°C na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba/SP.

Um total de 1.625 isolados de *Metarhizium* sp. foram recuperados do solo porém, neste estudo foram utilizados 293 isolados (Anexo A). O critério de escolha baseou-se na seleção aleatória de um isolado recuperado em cada ponto/fazenda com os três métodos de isolamento (meio seletivo e “Insect bait” com *G. mellonella* e *T. molitor*). Para tanto, consideramos os cinco biomas, os dois tipos de cultivo agrícola (anual e perene) e a área com vegetação nativa, as duas estações e os dois anos de coleta. Esses isolados incluem: (1) Setenta e seis isolados do Bioma Amazônia sendo 21 de vegetação nativa, 27 de cultivo de banana e 28 de milho; (2) Trinta e sete isolados do Bioma Caatinga, com 21 proveniente de vegetação nativa, 6 de cultivo de palma e 10 de feijão; (3) Cento e trinta isolados do Bioma Cerrado sendo 40 de vegetação nativa, 43 de cultivo de cana-de-açúcar, 36 de milho e 11 de soja; (4) Onze isolados de vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica e (5) Trinta e nove isolados de vegetação nativa do Bioma Pampa.

4.2.2 Extração do DNA, Amplificação e Sequenciamento

A extração de DNA, PCR e preparação das placas para sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Genética e Melhoramento do Departamento de Genética da ESALQ-USP.

A extração de DNA seguiu protocolo de Kepler et al. (2014) com algumas modificações. Conídios e hifas vegetativas de cada isolado cresceram por 5 a 7 dias ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 12 de fotofase) em pedaços (1,5 x 3,0 cm) de papel de filtro (Grade 2 - Whatman) estéril mantidos sobre meio de cultura Difco® em placas de Petri de 60 mm. A massa superficial de micélio e conídio que cresceu foi raspada do papel filtro com uma lâmina de bisturi (nº 23) estéril e transferida para tubos estéreis de 2 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Cada tubo apresentava 350 µL de tampão de extração (2,1 g de Sodium metasilicate (Sigma); 0,5 g de ácido cítrico (Sigma); 2,64 mL de 2-butoxy-ethanol-akaethyleno-glycol-butyl-ether (Sigma); 13,5 mL de 1 M de Tris-HCl; pH 7,0 e 200 mL de água destilada estéril), terra diatomácea e aproximadamente 0,5 g de cada uma das pérolas de zircônia-sílica de 1,0 e 2,3mm de diâmetro (Bio Spec Products Inc., Oklahoma, USA).

As células foram rompidas em um homogeneizador Bullet Blender Storm (Next Advance Inc., New York, USA) com 5 ciclos de 10 s e velocidade de 5.5 m/s. Os tubos foram mantidos em banho quente (100°C) por 10 min, centrifugados por 10 min a $14.000 \times g$ e o sobrenadante (175 µL) transferido para um novo microtubo estéril do tipo eppendorf (1,5 mL) e armazenado em freezer -20°C . Antes de ser utilizado na reação de PCR, o DNA de cada isolado foi diluído na proporção de 1:10 utilizando água destilada estéril.

Para o estudo de diversidade genética utilizamos a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3 (KEPLER; REHNER, 2013) por ter proporcionado um alto grau de diferenciação entre sequências de isolados brasileiros no estudo realizado por Rezende et al. (2015). Entretanto, este marcador se mostrou incapaz de reproduzir a filogenia para o clado PARB (*M. pingshaense* - *anisopliae* - *robertsii* - *brunneum*) proposto por Bischoff, Rehner e Humber (2009), por isso foi utilizado também a região 5'-TEF proposto por esses autores.

A reação de amplificação do “locus” intergênico nuclear MzIGS3 foi realizada com os oligonucleotídeos MzIGS3_1F (5'-CGTGGCTCCTGACCATGGTTGC) x MzIGS3_4R (5'-GCGGGGGAGCCGACTTGGA) e nos casos em que essa

combinação não proporcionou amplificação foram utilizados MzIGS3_2F (5' - GTGGCTCCTGACCATGGTTGC) x MzIGS3_4R (KEPLER; REHNER, 2013). A reação de PCR foi conduzida num volume final de 25 µL contendo 10 ng de DNA genômico, 1,25 mM de dNTPs, 7,5 pmol de cada um dos iniciadores, 0,75 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Wisconsin, USA) e 20% de 1X GoTaq® Reaction Buffer. Empregou-se o protocolo de “touchdown” iniciando com a desnaturação a 95°C por 2 min, seguida de 10 ciclos compostos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 62–52°C por 30 s decrescendo em 1°C por ciclo, extensão de 72°C por 1 min, seguido de 36 ciclos compostos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 52°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min, finalizando com extensão a 72°C por 15 min.

A região 5'-TEF foi amplificada com os oligonucleotídeos EF1T (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009). Na reação de amplificação foi utilizado 10 ng de DNA genômico, 62,5 mM de MgCl₂, 6,25 mM de dNTPs, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 1U Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Califórnia, USA) e 10% de 1x Taq Buffer em um volume final de 25 µL. O programa da PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40s, anelamento a 55°C por 45 s e polimerização a 72°C por 45 s, extensão final por 10 min a 72°C.

Após a amplificação, a qualidade e o tamanho dos produtos finais da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v). Os produtos 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) e oligonucleotídeos MzIGS3_2F x MzIGS3_5R (5' – TGARGGCTATGCSGGACGG) e EF1T x EF2T para os “loci” nucleares MzIGS3 e 5'-TEF, respectivamente (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009; KEPLER; REHNER, 2013).

O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando os equipamentos 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., Califórnia, USA) do CEBTEC (Laboratório de Biotecnologia Agrícola do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e ABI3500xl Genetic Analyzer (Applied

Biosystems®) do CBMEG (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil).

4.2.3 Montagem das sequências consenso e alinhamento múltiplo

As sequências de DNA individuais geradas em ambos os sentidos (“forward” e “reverse”) foram editadas manualmente, comparadas com seu respectivo eletroferograma e posteriormente, o alinhamento par a par foi realizado para obtenção da sequência consenso de cada indivíduo utilizando o programa Geneious 7.1 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand).

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.

4.2.4 Análise de Diversidade genética e Variância molecular (AMOVA)

Análises de diversidade genética e variância molecular foram realizadas com 303 sequências, obtidas da região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, de isolados de *Metarhizium* sp. recuperados em solo de cinco biomas brasileiros. Dessas, 10 sequências foram utilizadas no estudo de Rezende et al. (2015).

Os índices de diversidade genética como número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (H_d), diversidade nucleotídica (π), número de sítios polimórficos/sítios variáveis (V), número de sítios informativos para parcimônia (P_i) e número de mutações únicas/Singleton (S) foram estimados com o programa DnaSP v.5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). 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).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada utilizando o programa Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Esta análise 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. A base da análise apresentada é que as somas de quadrados convencionais (SQ) podem ser escritas na forma de

somas de quadrados de diferenças entre pares de observações. Desta forma, a análise de variância molecular hierárquica foi construída partindo diretamente da matriz das distâncias quadradas de todos os pares de haplótipos (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). O valor de Φ_{st} foi calculado para obter a variabilidade molecular de haplótipos entre grupos, considerando apenas dois níveis hierárquicos. A significância de Φ_{st} global foi testada por 20.000 permutações de haplótipos entre os grupos, enquanto as significâncias dos Φ_{st} entre pares de grupos foram testadas através de 1.000 permutações de haplótipos entre os grupos.

Em ambas análises, de índices de diversidade genética e AMOVA, as sequências foram separadas de acordo com a origem do isolado em: ano (2012 e 2013), estação (seca e úmida), método de isolamento (meio seletivo e “Insect bait”), espécies de insetos usados no método “Insect bait” (*G. mellonella* e *T. molitor*), áreas com vegetação nativa (considerando os cinco biomas), áreas com cultivos anuais (Bioma Amazônia com cultivo de milho, Bioma Cerrado com cultivo de milho e soja e Bioma Caatinga com cultivo de feijão) e áreas com cultivos perenes (Bioma Amazônia com cultivo de banana, Bioma Cerrado com cultivo de cana-de-açúcar e Bioma Caatinga com cultivo de palma). Somente a análise de diversidade genética foi realizada entre sequências separadas por espécie de *Metarhizium* sp.

4.2.5 Rede de Haplótipos e Inferência Filogenética Bayesiana

Uma matriz de dados foi construída com 318 sequências de isolados obtidas com a região intergênica MzIGS3. Desse total, 303 foram recuperados em solo de cinco biomas brasileiros com 10 destas, utilizadas no estudo de Rezende et al. (2015). Seis sequências foram de isolados provenientes de insetos, solo e um produto comercial, depositados entre 1980-2012 na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba/SP (REZENDE et al., 2015). Outras nove sequências são de isolados considerados “ex-type” ou de referência taxonomicamente autenticados onde sete são espécies do complexo *Metarhizium* atualmente reconhecidas como *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. guizhouense*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. pingshaense* e *M. robertsii* (KEPLER; REHNER, 2013).

O programa TCS v.1.21 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000), foi utilizado para obter uma rede não enraizada de haplótipos que revela as relações genealógicas entre as sequências. O TCS aplica a estatística de parcimônia pelo algoritmo desenvolvido por Templeton et al. (1992). O programa reúne as sequências originais em haplótipos e calcula uma matriz de distância (número de diferenças mutacionais) para todas as comparações par a par dos haplótipos até que o limite máximo de 100 passos mutacionais fosse fixado. O número de mutações acima deste limite é o número máximo de passos mutacionais entre pares de sequências justificado pelo critério de parcimônia (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000). Os “indels” foram considerados como quinto caráter, e foram codificados de tal forma que cada “indel”, independente do seu tamanho, foi considerado um único evento de mutação. Os “loops” presentes na rede foram desenvolvidos utilizando critérios baseados na teoria da coalescência (CRANDALL; TEMPLETON, 1993) como: (i) Critério de frequência: haplótipos são mais prováveis de estarem conectados com os haplótipos de maior frequência do que com os haplótipos raros; (ii) Critério topológico: haplótipos são mais prováveis de serem conectados com os haplótipos do interior do que com os haplótipos da extremidade e (iii) Critério geográfico: haplótipos são mais prováveis de estarem conectados com os haplótipos da mesma população ou região do que com haplótipos que ocorrem em populações distantes.

A análise de Inferência Filogenética Bayesiana foi realizada com auxílio do programa MrBayes v.3.2.4 (RONQUIST et al., 2012) com base nas cadeias de Markov Monte Carlo construídas com o algoritmo de Metropolis-Hastings. Para a seleção do modelo de evolução das sequências foi utilizado o Critério de Informação de Akaike (AIC) estimados com auxílio do programa jModelTest v.0.1.1 (POSADA, 2008). O modelo evolutivo selecionado foi GTR+G. A árvore foi construída com base em uma análise composta por quatro cadeias MCMC (três quentes e uma fria) com 15.000.000 de gerações amostradas a cada 100. A convergência para uma distribuição estacionária dos parâmetros amostrados foi avaliada baseando-se nos valores de médias do desvio padrão da verossimilhança, assumindo-se que a convergência foi alcançada a partir de valores do desvio padrão menor do que 0,01. A convergência dos parâmetros também foi verificada com auxílio do programa Tracer v.1.6 (RAMBAUT et al., 2014). As árvores geradas nos primeiros 25% de gerações foram consideradas como período de “burn in” e uma árvore consenso foi

obtida. A árvore gerada foi visualizada no programa FigTree v.1.3.1 (RAMBAUT, 2009). Os nós foram considerados com bom suporte estatístico quando a probabilidade posterior da IB foi $\geq 0,95$ (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2006).

4.2.6 Análise de Máxima Verossimilhança e Inferência Filogenética Bayesiana com a região 5'-TEF

Os isolados reconhecidos como haplótipos diferentes no estudo com o “locus” nuclear MzIGS3 foram sequenciados com a região 5' contida no fator de alongamento da tradução 1 alfa (5'-TEF). A matriz foi construída com 108 sequências, 65 foram de isolados recuperados em solo de cinco biomas brasileiros sendo que, dessas 12 foram utilizadas no estudo de Rezende et al. (2015). Três sequências foram de isolados provenientes de solo, inseto e produto comercial, depositados entre 1980-2012 na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba/SP (REZENDE et al., 2015), 16 sequências do estudo de Rocha et al. (2013), 3 sequências do estudo de Lopes et al. (2013a), 3 sequências de Lopes et al., (2013b) e 9 sequências do estudo de Lopes et al. (2014). Neste conjunto também foram incluídas nove sequências de isolados considerados “ex-type” ou de referência taxonomicamente autenticados que inclui *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. guizhouense*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. pingshaense* e *M. robertsii* (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009).

A análise de Inferência Filogenética Bayesiana foi realizada com auxílio do programa MrBayes v.3.2.4 (RONQUIST et al., 2012) com base nas cadeias de Markov Monte Carlo construídas com o algoritmo de Metropolis-Hastings. Para a seleção do modelo de evolução das sequências foi utilizado o Critério de Informação de Akaike (AIC) estimados com auxílio do programa jModelTest v.0.1.1 (POSADA, 2008). O modelo evolutivo selecionado para o “locus nuclear” 5'-TEF foi o TPM1+G. A árvore foi construída com base na análise composta por quatro cadeias MCMC (três quentes e uma fria) e 5.000.000 de gerações, amostradas a cada 100. A convergência para uma distribuição estacionária dos parâmetros amostrados foi avaliada com base nos valores de médias do desvio padrão da verossimilhança, assumindo-se que a convergência foi alcançada a partir de valores do desvio padrão

menor do que 0,01. A convergência dos parâmetros também foi verificada com auxílio do programa Tracer v.1.6 (RAMBAUT et al., 2014). As árvores geradas nos primeiros 25% de gerações foram consideradas como período de “burn in” e uma árvore consenso foi obtida.

A análise de Máxima Verossimilhança foi realizada com auxílio do programa raxmlGUI v.1.3.1 (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).

As árvores geradas pelos métodos Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Filogenética Bayesiana (IB) foram visualizadas e editadas com auxílio dos programas MEGA6 (TAMURA et al., 2013) e FigTree v.1.3.1 (RAMBAUT, 2009), respectivamente. Os nós foram considerados com bom suporte estatístico quando os valores de “bootstrap” de MV foi $\geq 70\%$ e a probabilidade posterior da IB foi $\geq 0,95$ (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2006). Os valores de “bootstrap” de MV foram incluídos na árvore de IB.

4.3 Resultados

4.3.1 Diversidade genética

A análise de 303 sequências de *Metarhizium* spp., com 927 pares de bases da região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, identificou 249 sítios polimórficos sendo 178 informativos para parcimônia e 71 mutações únicas (Singletons). No total foram encontrados 40 haplótipos com diversidade haplotípica ($H_d = 0,777$) e diversidade nucleotídica ($\pi = 0,025$) (Tabela 4.1).

Nas comparações entre anos (2012 e 2013), entre estações (seca e úmida), entre métodos de isolamento (meio seletivo e “Insect bait”) e entre espécies de insetos usados no método “Insect bait” (*G. mellonella* e *T. molitor*) não foram observadas diferenças significativas nos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica. O número de isolados obtidos pelo método de isolamento meio seletivo foi menor ($n = 94$) do que por “Insect bait” ($n = 209$). Apenas 35% (14/40) dos haplótipos foram encontrados consecutivamente nos dois anos, 32,5% foram encontrados nas duas estações, 45% encontrados pelos dois métodos de

isolamento e 32,5% nas duas espécies de insetos pelo método “Insect bait”. Os haplótipos H2, H3, H5 de *M. robertsii*, H9, H15 de *M. anisopliae*, H4, H7 de *M. pinghaense* e H1, H11 de *Metarhizium* sp. indet.1 foram detectados nos dois anos, nas duas estações, pelos dois métodos e nas duas espécies de insetos.

A diversidade de *Metarhizium* spp. foi maior em vegetação nativa do que em cultivo anual e perene. Nas análises feitas apenas com sequências de isolados recuperados de áreas de vegetação nativa dos cinco biomas, o maior número de haplótipos de *Metarhizium* spp. foi obtido na Amazônia (12 haplótipos em 24 sequências). Os maiores valores de diversidade haplotípica (H_d) foram observados nos biomas Mata Atlântica e Amazônia ($H_d = 0,873$ e $0,822$, respectivamente). A maior diversidade nucleotídica foi observada na Caatinga ($\pi = 0,048$), seguida por Amazônia e Mata Atlântica ($\pi = 0,034$ e $0,032$, respectivamente). O bioma Pampa foi o que apresentou os menores índices de diversidade de *Metarhizium* spp., com a diversidade nucleotídica quase cinco vezes menor do que na Caatinga e a diversidade haplotípica aproximadamente duas vezes menor do que na Mata Atlântica.

Entre as 86 sequências de DNA de isolados obtidos em solo de cultivo anual e 76 sequências de cultivo perene, foram identificados 16 e 10 haplótipos, respectivamente. As maiores diversidades tanto haplotípica quanto nucleotídica nos dois tipos de cultivo foram observadas no bioma Amazônia (em milho e banana) e as menores diversidades foram observadas no Cerrado em milho/soja e cana-de-açúcar. Somente três haplótipos foram obtidos dentre 43 sequências de isolados recuperados em solo de cana-de-açúcar no Cerrado.

Comparando as sequências por espécie, o maior número de haplótipos (15 haplótipos em 38 sequências) foi obtido entre sequências de *Metarhizium* sp. indet. 1. Os valores de diversidade haplotípica ($H_d = 0,910$) e de diversidade nucleotídica ($\pi = 0,0283$) desta espécie foram muito superiores aos encontrados para as outras espécies (Tabela 4.2). Aproximadamente 65% dos isolados obtidos neste estudo pertencem a *M. robertsii* com 13 haplótipos, sendo a diversidade haplotípica e nucleotídica desta espécie inferior à de *M. pingshaense* e *M. anisopliae*, respectivamente. Somente foram encontrados um haplótipo de *Metarhizium* sp. indet. 3 ($n=7$), um haplótipo de *Metarhizium* sp. indet. 2 ($n=1$) e dois haplótipos não associados a nenhuma espécie e por conseguinte não foram calculados os índices de diversidade para estas linhagens.

Nas análises realizadas apenas com sequências de *M. robertsii* (dados não apresentados) destaca-se o fato de a diversidade na vegetação nativa ser pelo menos 5,0 e 3,6 vezes maior do que nos cultivos anuais e perenes, respectivamente. Na vegetação nativa, a Mata Atlântica apresentou os maiores valores de diversidade. Já na Amazônia, os dois haplótipos obtidos por diferença de uma única mutação (Singleton) resultaram na menor diversidade nucleotídica observada neste estudo ($\pi = 0,0002$). Nos cultivos anual e perene, a Amazônia (solo de banana e milho, respectivamente) apresentou os maiores valores de diversidade. Os isolados obtidos em solo nos dois cultivos na Caatinga e cana-de-açúcar no Cerrado representaram somente um haplótipo o que resultou em uma diversidade haplotípica e nucleotídica igual a zero.

Tabela 4.1 - Número de indivíduos, designação haplotípica e índices de diversidade genética de isolados de *Metarhizium* spp. agrupados de acordo com sua origem

(continua)

Grupo	N	H	Distribuição dos Haplótipos	Hd	π	V	Pi	S
Ano	303	40		0,777	0,025	249	178	71
2012	138	26	H1(6), H2(61), H3(20), H4(4), H5(3), H7(1), H9(5), H11(2), H15(11), H16(4), H17(1), H19(1), H22(5), H23(1), H25(1), H27(1), H29(1), H31(1), H32(2), H33(1), H34(1), H36(1), H37(1), H38(1), H39(1), H40(1)	0,775	0,022	189	111	78
2013	165	28	H1(3), H2(72), H3(22), H4(6), H5(1), H6(2), H7(12), H8(2), H9(1), H10(7), H11(4), H12(1), H13(1), H14(1), H15(14), H18(1), H20(1), H21(2), H24(1), H26(1), H27(1), H28(1), H29(2), H30(1), H31(1), H32(1), H33(1), H35(2)	0,779	0,028	202	165	37
Estação	303	40		0,777	0,025	249	178	71
úmida	163	28	H1(8), H2(71), H3(18), H4(4), H5(2), H6(2), H7(8), H9(3), H10(3), H11(3), H14(1), H15(20), H18(1), H19(1), H21(2), H22(1), H24(1), H25(1), H26(1), H28(1), H29(2), H32(2), H34(1), H35(2), H37(1), H38(1), H39(1), H40(1)	0,780	0,026	224	161	63
seca	140	25	H1(1), H2(62), H3(24), H4(6), H5(2), H7(5), H8(2), H9(3), H10(4), H11(3), H12(1), H13(1), H15(5), H16(4), H17(1), H20(1), H22(4), H23(1), H27(2), H29(1), H30(1), H31(2), H32(1), H33(2), H36(1)	0,771	0,024	188	162	26
Método	303	40		0,777	0,025	249	178	71
Meio seletivo	94	24	H1(2), H2(39), H3(9), H4(4), H5(1), H7(3), H8(1), H9(2), H10(1), H11(2), H15(13), H16(2), H17(1), H22(2), H24(1), H26(1), H27(1), H28(1), H29(2), H30(1), H31(1), H32(2), H34(1), H35(1)	0,801	0,027	197	115	82
“Insect bait”	209	34	H1(7), H2(94), H3(33), H4(6), H5(3), H6(2), H7(10), H8(1), H9(4), H10(6), H11(4), H12(1), H13(1), H14(1), H15(12), H16(2), H18(1), H19(1), H20(1), H21(2), H22(3), H23(1), H25(1), H27(1), H29(1), H31(1), H32(1), H33(2), H35(1), H36(1), H37(1), H38(1), H39(1), H40(1)	0,766	0,024	222	163	59
“Insect bait”	209	34		0,766	0,024	222	163	59
<i>G. mellonella</i>	105	23	H1(2), H2(48), H3(17), H4(2), H5(2), H7(9), H8(1), H9(3), H10(3), H11(2), H12(1), H13(1), H14(1), H15(2), H16(1), H18(1), H21(1), H22(2), H27(1), H31(1), H32(1), H33(2), H39(1)	0,760	0,024	176	152	24

Tabela 4.1 - Número de indivíduos, designação haplotípica e índices de diversidade genética de isolados de *Metarhizium* spp. agrupados de acordo com sua origem

(conclusão)								
Grupo	N	H	Distribuição dos Haplótipos	Hd	π	V	Pi	S
<i>T. molitor</i>	104	24	H1(5), H2(46), H3(16), H4(4), H5(1), H6(2), H7(1), H9(1), H10(3), H11(2), H15(10), H16(1), H19(1), H20(1), H21(1), H22(1), H23(1), H25(1), H29(1), H35(1), H36(1), H37(1), H38(1), H40(1)	0,772	0,025	205	144	61
Vegetação nativa	141	29		0,867	0,030	213	167	46
Amazônia	24	12	H2(10), H3(1), H9(1), H10(1), H15(3), H17(1), H25(1), H27(2), H33(1), H38(1), H39(1), H40(1)	0,822	0,034	162	78	84
Caatinga	22	6	H3(5), H7(2), H10(6), H15(7), H16(1), H34(1)	0,797	0,048	112	106	6
Cerrado	42	10	H1(6), H2(22), H8(2), H11(3), H12(1), H16(1), H20(1), H29(2), H32(3), H33(1)	0,705	0,025	95	79	16
Mata Atlântica	11	6	H6(2), H7(3), H9(1), H15(3), H16(1), H36(1)	0,873	0,032	75	52	23
Pampa	42	6	H3(31), H5(3), H14(1), H18(1), H19(1), H22(5)	0,445	0,010	40	25	15
Cultivo anual*	86	16		0,585	0,021	152	99	53
Milho (AMA)	29	11	H2(13), H3(2), H5(1), H7(3), H9(3), H13(1), H15(1), H26(1), H30(1), H35(2), H37(1)	0,788	0,028	126	83	43
Feijão (CAA)	10	3	H2(5), H7(1), H15(4)	0,644	0,023	51	30	21
Milho/Soja (CER)	47	7	H1(3), H2(37), H11(3), H15(1), H23(1), H28(1), H29(1)	0,378	0,014	100	55	45
Cultivo perene *	76	10		0,612	0,020	89	85	4
Banana (AMA)	27	9	H2(3), H3(3), H4(10), H7(4), H9(1), H15(2), H16(1), H24(1), H31(2)	0,832	0,029	85	81	4
Palma (CAA)	6	2	H2(3), H15(3)	0,600	0,020	30	30	0
Cana-de-açúcar (CER)	43	3	H2(40), H15(1), H21(2)	0,135	0,005	51	36	15

N=Tamanho da amostra; H=Número de haplótipos; Hd=Diversidade haplotípica; π =Diversidade nucleotídica; V=Sítios variáveis; Pi=Sítios informativos para parcimônia e S=Singleton.

* Bioma Amazônia (AMA), Bioma Caatinga (CAA) e Bioma Cerrado (CER).

Tabela 4.2 - Número de indivíduos, designação haplotípica e índices de diversidade genética de isolados de *Metarhizium* spp. separados de acordo com a espécie

Espécie	N	H	Distribuição dos Haplótipos	Hd	π	V	Pi	S
<i>Metarhizium robertsii</i>	197	13	H2(133), H3(42), H5(4), H6(2), H14(1), H16(4), H18(1), H19(1), H20(1), H22(5), H23(1), H24(1), H34(1)	0,500	0,0052	47	41	6
<i>Metarhizium anisopliae</i>	35	6	H9(6), H15(25), H36(1), H37(1), H38(1), H39(1)	0,471	0,0077	46	28	18
<i>Metarhizium pingshaense</i>	23	2	H4(10), H7(13)	0,514	0,0005	1	1	0
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	38	15	H1(9), H8(2), H11(6), H12(1), H13(1), H21(2), H25(1), H27(2), H28(1), H29(3), H30(1), H31(2), H32(3), H33(2), H35(2)	0,910	0,0283	110	80	30

N=Tamanho da amostra; H=Número de haplótipos; Hd=Diversidade haplotípica; π =Diversidade nucleotídica; V=Sítios variáveis; Pi=Sítios informativos para parcimônia e S=Singleton.

4.3.2 Variância molecular (AMOVA)

A análise de variância molecular considerando dois níveis hierárquicos mostrou significativa subdivisão ($p \leq 0,001$) entre os grupos de sequências separados por ano (2012 e 2013), por estação (seca e úmida), por método de isolamento (meio seletivo e “Insect bait”), por espécie de inseto usado no método “Insect bait” (*G. mellonella* e *T. molitor*), por áreas com vegetação nativa, por tipo de cultivo anual e cultivo perene (Tabela 4.3). A maior variação genética ocorreu dentro de cada ano (77,69%) quando a comparação foi feita entre o ano de 2012 e 2013 ($\Phi_{st}=0,223$). Da mesma forma; a maior variação genética ocorreu dentro de cada estação (77,54% e $\Phi_{st}=0,224$); de cada método de isolamento (78,19% e $\Phi_{st}=0,218$); de cada espécie de inseto usado no método “Insect bait” (76,58% e $\Phi_{st}=0,234$); de cada área com vegetação nativa (68,08% e $\Phi_{st}=0,319$) e de cada tipo de cultivo anual (56,62% e $\Phi_{st}=0,433$). Por outro lado, nas comparações feitas entre cultivos perenes, a maior parte da variação ocorreu entre os cultivos (55,57%) e não dentro de cada cultivo.

Quando a AMOVA foi realizada apenas com as 197 sequências de *M. robertsii* ($p \leq 0,001$, dados não apresentados), resultados opostos foram observados, sendo que a maior parte da variação genética ocorreu entre anos ($\Phi_{ST}=0,500$), entre estação ($\Phi_{ST}=0,501$), entre método de isolamento ($\Phi_{ST}=0,503$), entre áreas com vegetação nativa ($\Phi_{ST}=0,659$), entre cultivos anuais ($\Phi_{ST}=0,869$) e entre cultivos perenes ($\Phi_{ST}=0,864$). Para as espécies de insetos usados no método “Insect bait” a maior parte da variação esteve dentro (51,3% e $\Phi_{ST}=0,487$) de cada espécie.

Tabela 4.3 – Análise de variância molecular (AMOVA), em sequências de isolados de *Metarhizium* spp., utilizando a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3

Grupo	GL	SQ	Componente de Variância	Variância (%)	Índice de Fixação	P (valor)
Ano (2012 vs 2013)						
Entre ano	1	17,158	0,1115 Va	22,31	$\Phi_{ST}=0,223$	(<0,001)
Dentro de ano	301	116,942	0,3885 Vb	77,69		
Total	302	134,099	0,5000			
Estação (Úmida vs Seca)						
Entre estação	1	17,307	0,1123 Va	22,46	$\Phi_{ST}=0,224$	(<0,001)
Dentro de estação	301	116,742	0,3878 Vb	77,54		
Total	302	134,050	0,5001			
Método (Meio seletivo vs “Insect bait”)						
Entre método	1	14,436	0,1083 Va	21,81	$\Phi_{ST}=0,218$	(<0,001)
Dentro de método	301	116,913	0,3884 Vb	78,19		
Total	302	131,350	0,4967			
“Insect bait” (<i>G. mellonella</i> vs <i>T. molitor</i>)						
Entre insetos	1	12,621	0,1171 Va	23,42	$\Phi_{ST}=0,234$	(<0,001)
Dentro de insetos	207	79,255	0,3828 Vb	76,58		
Total	208	91,876	0,4999			
Vegetação nativa (Amazônia vs Caatinga vs Cerrado vs Pampa vs Mata Atlântica)						
Entre vegetação nativa	4	18,321	0,1577 Va	31,92	$\Phi_{ST}=0,319$	(<0,001)
Dentro de vegetação nativa	136	45,757	0,3364 Vb	68,08		
Total	140	64,078	0,4942			
Cultivos anuais* [Milho (AMA) vs Feijão (CAA) vs Milho e Soja (CER)]						
Entre cultivos	2	10,863	0,2089 Va	43,38	$\Phi_{ST}=0,433$	(<0,001)
Dentro de cultivos	83	22,637	0,2727 Vb	56,62		
Total	85	33,500	0,4817			
Cultivos perenes* [Banana (AMA) vs Palma (CAA) vs Cana-de-açúcar (CER)]						
Entre cultivos	2	11,216	0,2596 Va	55,57	$\Phi_{ST}=0,555$	(<0,001)
Dentro de cultivos	73	15,152	0,2075 Vb	44,43		
Total	75	26,368	0,4671			

* Bioma Amazônia (AMA), Bioma Caatinga (CAA) e Bioma Cerrado (CER).

4.3.3 Rede de Haplótipos

Entre as 318 sequências de isolados obtidas da região intergênica MzIGS3 foram revelados 50 haplótipos (Figura 4.1). Desses, 40 haplótipos foram de isolados recuperados de amostras de solo dos biomas brasileiros sendo 27 haplótipos ainda não descritos na literatura. Os outros 10, são haplótipos com sequência única e de referência (ARSEF, CBS, ESALQ). Do total, 16 haplótipos pertencem a *Metarhizium* sp. indet. 1, 14 de *M. robertsii*, 9 de *M. anisopliae*, 3 de *M. pingshaense* e um único haplótipo de *Metarhizium* sp. indet. 2, *Metarhizium* sp. indet. 3, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. guizhouense* e *M. brunneum*, e dois haplótipos de espécie não identificada.

O haplótipo de maior frequência foi o H2 (n=134 isolados) de *M. robertsii*. Esses isolados encontram-se amplamente distribuídos no solo de áreas com vegetação nativa e cultivos anuais e perenes dos biomas Amazônia e Cerrado e em área com cultivos anuais e perenes na Caatinga (Figura 4.1). O segundo haplótipo de maior frequência foi H3 (n=42), também de *M. robertsii*, provenientes de solo com três tipos de vegetação (nativa e cultivo anual e perene) da Amazônia e em área de vegetação nativa dos biomas Caatinga e Pampa. 73,8% dos isolados de H3 foram coletados em solo no Pampa. Nos haplótipos restantes de *M. robertsii*, oito deles são de sequências únicas sendo três encontrados no solo de vegetação nativa do Pampa. O haplótipo H22 (n=5), também desta espécie, compartilhou isolados coletados somente no Pampa.

O terceiro haplótipo mais frequente (H15) pertence a *M. anisopliae* (n= 26 isolados). Este haplótipo foi detectado em área de vegetação nativa da Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica e áreas de cultivos anuais e perenes da Amazônia, Caatinga e Cerrado (Figura 4.1). O haplótipo H9 de *M. anisopliae* compartilha isolados provenientes de solo dos biomas Amazônia e Mata Atlântica e de insetos (Crambidae e Cercopidae). Esses isolados de insetos são de referência da coleção ESALQ. Os demais haplótipos dessa espécie são formados por uma única sequência.

O haplótipo H7 (n=13) de *M. pingshaense* foi encontrado em solo de três biomas (Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica) com o maior número de isolados recuperado no cultivo de banana (Figura 4.1). O haplótipo H4 (n=10) de *M.*

pingshaense compartilha isolados que foram recuperados exclusivamente nessa cultura.

Para *Metarhizium* sp. indet. 1, os haplótipos H1 (n=9), H11 (n=6), H29 e H32 (n=3) foram detectados somente em solo com cultivo de soja e área de vegetação nativa no Cerrado (Figura 4.1). O restante dos haplótipos, que apresentaram baixa frequência ($\leq 5\%$), ocorreram em solo das áreas com dois cultivos e vegetação nativa dos biomas Amazônia e Cerrado. O haplótipo H40 da espécie *Metarhizium* sp. indet. 2 está separado de *M. lepidiotae* por 108 passos mutacionais e de *M. brunneum* por 76 passos mutacionais. O haplótipo H10 (n=7) de *Metarhizium* sp. indet. 3 está separado de *M. guizhouense* por 36 passos mutacionais.

O haplótipo H26 foi representado apenas por um isolado, não identificado, e está a 35 passos mutacionais do haplótipo H2 de *M. robertsii*. O haplótipo H17 foi também representado por um isolado não identificado e está a 33 passos mutacionais do haplótipo H47, também de *M. robertsii* (isolado de referência ARSEF 7501).

Figura 4.1 – Rede de haplótipos baseada em sequências (927pb) de isolados de *Metarhizium* sp. obtidas a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3. O tamanho da circunferência é proporcional a frequência do haplótipo. As frequências dos haplótipos são representadas pelo tipo de vegetação dos solos onde os isolados foram coletados. Passos mutacionais estão representados pelos círculos menores em branco e pretos

4.3.4 Distribuição dos haplótipos de *Metarhizium* sp.

A distribuição geográfica dos haplótipos obtidos com o “locus” intergênico nuclear MzIGS3 de *Metarhizium* spp. (n=303 isolados) são mostrados na Figura 4.2.

O bioma Amazônia foi o único que apresentou haplótipos das seis linhagens de *Metarhizium* reconhecidas neste estudo (*M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. pingshaense*, *Metarhizium* sp. indet. 1, *Metarhizium* sp. indet. 2 e *Metarhizium* sp. indet. 3) inclusive os haplótipos dos dois isolados que não foram identificados. Por outro lado, na vegetação nativa do bioma Pampa foi detectado apenas haplótipos de *M. robertsii* nas amostras de solo.

Grande parte dos haplótipos recuperados em solo de cultivo de milho e cana-de-açúcar no bioma Cerrado foram de *M. robertsii*. Nas áreas com vegetação nativa e soja deste mesmo bioma, *Metarhizium* sp. indet. 1 ocorreu em 43 e 72% dos haplótipos, respectivamente. Somente 2 (1,5%) isolados foram de *M. anisopliae*.

Na vegetação nativa do bioma Mata Atlântica o número de isolados com haplótipos que se referem a espécie *M. anisopliae* foi maior do que de *M. robertsii* e *M. pingshaense*. Na Caatinga, o número de isolados com haplótipos de *M. anisopliae* foi igual ao de *M. robertsii*, exceto no feijão onde *M. robertsii* apresentou um isolado a mais do que *M. anisopliae*. De um total de sete isolados do haplótipo que representa *Metarhizium* sp. indet. 3, seis isolados foram encontrados em área de vegetação nativa do bioma Caatinga.

Figura 4.2 – Distribuição dos haplótipos obtidos com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3 de *Metarhizium* sp. Sequências (n=303) de isolados recuperados em solo de áreas com vegetação nativa de cinco biomas e agrícolas (anual e perene) de três biomas brasileiros, em duas estações (úmida e seca) dos anos 2012 e 2013. Cada círculo corresponde ao haplótipo encontrado para cada isolado de fungo entomopatogênico

4.3.5 Inferência Filogenética Bayesiana

A árvore gerada pela análise de Inferência Filogenética Bayesiana separou os isolados de *Metarhizium* spp., recuperados em solo de cinco biomas brasileiros, em agrupamentos congruentes com as linhagens *M. robertsii* s.l., *M. anisopliae* s.l., *M. pingshaense*, *Metarhizium* sp. indet. 1, *Metarhizium* sp. indet. 2 e uma nova linhagem não caracterizadas taxonomicamente, referida como *Metarhizium* sp. indet. 3. A denominação para as linhagens indeterminadas 1 e 2 já havia sido utilizada anteriormente por Rezende et al. (2015) quando utilizou isolados proveniente de solo dos biomas. Duas sequências de isolados brasileiros não foram atribuídas a nenhuma espécie devido ao baixo valor de probabilidade posterior gerado na análise Bayesiana (Tabela 4.4 e Figura 4.3).

As sequências que representam *M. robertsii* s.l. (n=199) formaram dois clados. O primeiro clado (n=179) apresentou 4 grupos de haplótipos com sequências idênticas aos isolados ARSEF 727 (haplótipo H2), ESALQ 1631 (H3). Os haplótipos H19 e H6, representados por uma e duas sequências, respectivamente, são novos e reconhecidas somente neste estudo. O segundo clado (n=20) foi formado por 10 grupos de haplótipos. Destes, três haplótipos são formados por sequências idênticas à dos isolados de referência ESALQ 1620 (haplótipo H22), ESALQ 1632 (H5) e ESALQ 1635 (H16), os outros seis haplótipos são novos e representados por sequências únicas e o haplótipo restante foi representado pelo isolado “ex-tipo” ARSEF 7501.

M. anisopliae s.l. (n=42 isolados) também formou dois clados. No primeiro clado (n=36), formado por 3 grupos de haplótipos, as sequências foram idênticas ao isolado ARSEF 6347 (haplótipo H15) e ESALQ 935, 1594 e 385 (H9). O haplótipo restante (H42) apresentou sequência única derivada de um isolado de referência ESALQ 1604. O segundo clado (n=6) foi formado por seis grupos de haplótipos com sequências únicas sendo um deles o isolado de referência ARSEF 7487 e outro um haplótipo novo.

Metarhizium sp. indet. 1 (n=39 isolados) apresentou dois clados, com o primeiro formado por dois grupos de haplótipos novos com isolados recuperados em solo neste estudo. O segundo clado apresentou 14 grupos de haplótipos sendo 11 haplótipos novos. As sequências dos outros três haplótipos se agruparam com os

isolados de referência ESALQ 1638 (haplótipo H1), ESALQ 1639 (H32) e ESALQ 1374 (H41).

Os isolados de *M. pingshaense* (n=24 isolados) formaram três haplótipos sendo dois (haplótipos H7 e H4) novos e formados por sequências de isolados brasileiros recuperados no solo dos biomas. O terceiro haplótipo (H50), com sequência única, é representado pelo isolado de referência taxonômica CBS 257.90. *Metarhizium* sp. indet. 3 (n=7 isolados) foi representado por um haplótipo único e novo (H10). A formação deste ramo recebeu alto valor de probabilidade posterior e “bootstrap” e por isso, provavelmente representa mais uma nova espécie para este gênero. *Metarhizium* sp. indet. 2 representou um único haplótipo do isolado de referência ESALQ 1636, proveniente de solo do bioma Amazônia. Apesar de outras sequências do mesmo local terem sido adicionadas no presente estudo nenhuma foi igual à ela.

Tabela 4.4 – Isolados de *Metarhizium* sp. representantes de cada haplótipo (H) com seu respectivo código de acesso e espécie

Espécie ^a	Haplótipo (n°)*	Isolados (ESALQ)
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 3364 (H4)	2371, 2540, 2541, 2543, 3124, 4108, 4185, 4288, 4314
	ESALQ 2407 (H7)	3235, 3236, 3237, 3350, 3352, 4152, 4284, 4290, 4395, 4445, 4457, 4775
	CBS 257.90^b (H50)	-
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 935^d (H9)	1594^d, 385^d , 2292, 2787, 3167, 4844, 4928, 4931
	ARSEF 6347^b (H15)	1791, 1793, 1804, 1813, 1814, 1816, 1989, 2362, 2562, 4090, 4133, 4258, 4265, 4266, 4267, 4331, 4580, 4581, 4725, 4729, 4767, 4776, 4797, 4920 e 4926
	ESALQ 4676 (H36)	-
	ESALQ 1616^c (H37)	-
	ESALQ 1614^c (H38)	-
	ESALQ 1607^c (H39)	-
	ESALQ 1604^d (H42)	-
	ESALQ 1592^d (H43)	-
	ARSEF 7487^b (H44)	-
	ARSEF 727^b (H2)	1621, 1624, 1890, 1932, 1933, 1935, 1952, 1958, 1959, 1967, 1987, 1988, 2001, 2025, 2044, 2068, 2080, 2091, 2128, 2130, 2140, 2149, 2213, 2219, 2232, 2300, 2391, 2409, 2412, 2413, 2421, 2439, 2442, 2443, 2445, 2455, 2461, 2461, 2555, 2559, 2561, 2746, 2750, 2753, 2759, 2790, 2795, 2801, 2842, 2843, 2962, 2966, 2976, 2985, 2988, 3111, 3114, 3125, 3165, 3226, 3229, 3231, 3248, 3253, 3255, 3256, 3348, 3362, 3625, 3641, 3642, 3647, 3708, 3716, 3718, 3725, 3729, 3748, 3749, 3912, 3917, 3918, 3921, 3926, 3927, 3969, 3972, 3973, 4155, 4161, 4168, 4307, 4321, 4323, 4327, 4354, 4368, 4375, 4399, 4403, 4406, 4409, 4413, 4418, 4420, 4424, 4553, 4584, 4590, 4595, 4599, 4638, 4689, 4709, 4712, 4714, 4715, 4747, 4748, 4750, 4753, 4777, 4780, 4791, 4794, 4796, 4814, 4818, 4853, 4857, 4859, 4932 e 4933
	ESALQ 1631^c (H3)	1619, 1891, 1915, 1918, 2191, 2316, 2326, 2493, 2752, 2960, 2973, 3127, 3158, 3743, 3745, 3929, 3936, 3943, 3980, 3984, 4117, 4120, 4130, 4181, 4189, 4192, 4194, 4200, 4339, 4622, 4630, 4669, 4672, 4674, 4677, 4718, 4918, 4919, 4924, 4927 e 4930
<i>M. robertsii</i>	ESALQ 1632^c (H5)	1887, 2957 e 4125
	ESALQ 3964 (H6)	3959
	ESALQ 3151 (H14)	-
	ESALQ 1635^c (H16)	2364, 2786 e 2956
	ESALQ 3149 (H18)	-
	ESALQ 2486 (H19)	-
	ESALQ 3711 (H20)	-
	ESALQ 1620^c (H22)	1620, 2322, 4629 e 4917
	ESALQ 2450 (H23)	-
	ESALQ 4311 (H24)	-
	ESALQ 1747 (H34)	-
	ARSEF 7501^b (H47)	-
<i>M. brunneum</i>	ARSEF 2107^b (H46)	-
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 1638^c (H1)	1781, 1833, 2048, 2071, 2989, 3735, 3996 e 4002
	ESALQ 4532 (H8)	3651
	ESALQ 3742 (H11)	2474, 2553, 3616, 3731 e 4823
	ESALQ 3664 (H12)	-
	ESALQ 3715 (H13)	-
	ESALQ 4764 (H21)	4164
	ESALQ 4925 (H25)	-
	ESALQ 4069 (H27)	4876
	ESALQ 4829 (H28)	-
	ESALQ 4207 (H29)	2030 e 4544
	ESALQ 4637 (H30)	-
	ESALQ 4287 (H31)	2370
	ESALQ 1639^c (H32)	2101 e 4548
	ESALQ 4073 (H33)	2383
	ESALQ 4614 (H35)	4376
	ESALQ 1374^d (H41)	-
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 2	ESALQ 1636^c (H40)	-
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	ESALQ 3947 (H10)	2812, 3239, 3240, 3746, 3988, 3991, 4615, 4684
<i>M. lepidiotae</i>	ARSEF 7488^b (H45)	-
<i>M. majus</i>	ARSEF 1914^b (H48)	-
<i>M. guizhouense</i>	CBS 258.90^b (H49)	-
Não identificada	ESALQ 2812 (H17)	-
	ESALQ 4615 (H26)	-

ESALQ = Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves”, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brasil.

*Os isolados em negrito foram utilizados como referência.

^aIsolados sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3 (KEPLER; REHNER, 2013).

^bIsolados considerados “ex-type” ou de referência taxonomicamente autenticados. ARSEF=Agricultural Research Service Entomopathogenic Fungus Collection, USDA, NY, EUA; CBS=Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

^cIsolados provenientes dos cinco biomas brasileiros utilizados no estudo de Rezende et al. (2015).

^dIsolados depositados na Coleção “Prof. Sérgio Batista Alves” de 1980 a 2012 utilizados no estudo de Rezende et al. (2015).

Figura 4.3 – Árvore de Inferência Filogenética Bayesiana inferida do alinhamento de 318 sequências com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3. Em negrito estão os isolados de referência e aqueles indicados com estrela preta se referem aos isolados taxonomicamente autenticados, ARSEF e CBS (KEPLER; REHNER, 2013). Apenas os valores de probabilidade de Inferência Bayesiana $\geq 0,95$ estão representados nos nós. ^aClado de *M. robertsii* s.l. com 179 sequências de isolados distribuídos em quatro haplótipos (H2, H3, H6 e H19); ^bClado de *M. anisopliae* s.l. com 9 sequências representadas pelo haplótipo H9 e ^cClado de *M. anisopliae* s.l. com 26 sequências representadas pelo haplótipo H15. Informações complementares podem ser encontradas na Tabela 4.4 e Anexo A

4.3.6 Filogenia dos isolados de *Metarhizium* spp.

Para a correta identificação e construção de um contexto filogenético confiável dos isolados de *Metarhizium* sp. recuperados em solo de cinco biomas brasileiros, amplificamos a região 5' contida no fator de alongamento da tradução 1 alfa (5'-TEF) (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009) que resultou em sequências com 599 pares de bases. Entre as 108 sequências utilizadas foi revelado um total de 36 haplótipos sendo que oito deles ainda não descritos na literatura.

As análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana produziram topologias congruentes, com os isolados de *Metarhizium* sp. distribuídos em quinze grupos terminais com oito clados atualmente reconhecidos dentro dos limites de espécie. Destes, três clados que incluem *M. anisopliae* s.l., *M. robertsii* s.l. e *M. pingshaense* e compõe o clado PARB (*M. pingshaense-anisopliae-robertsii-brunneum*) (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009) apresentaram sequências de isolados dos biomas brasileiros. Outras três linhagens adicionais apresentando sequências de isolados brasileiros, não identificadas taxonomicamente, foram referidas como *Metarhizium* sp. indet. 1, *Metarhizium* sp. indet. 2 e uma nova linhagem *Metarhizium* sp. indet. 3 (Figura 4.4). A denominação para as linhagens indeterminadas 1 e 2, como mencionado anteriormente, foi utilizada recentemente por Rezende et al. (2015). Duas sequências não foram atribuídas a nenhuma espécie devido aos baixos valores de “bootstrap” e probabilidade posterior gerados nas análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana, respectivamente.

Sequências da região 5'-TEF de *M. robertsii* s.l. incluíram cinco grupos de haplótipos com quatro deles formando clado monofilético robusto e fortemente suportado. Estes clados foram referidos como Mrob1 (n=4), Mrob 2 (n=7), Mrob 3 (n=2) e Mrob 4 (n=2). Mrob 1 e Mrob 2 se agruparam com os isolados de referência ARSEF 727 e ARSEF 7501, respectivamente. Os haplótipos de Mrob 3 e Mrob 4 apresentaram sequências idênticas aos isolados ESALQ 1633 e ESALQ 1632 e ESALQ 1635, respectivamente. Mrob 2 e Mrob 3 receberam suporte significativo de “bootstrap” e probabilidade posterior. Mrob 4, entretanto, apresentou suporte apenas para probabilidade posterior da Inferência Bayesiana. O clado Mrob 1 não apresentou valores significativos de “bootstrap” e probabilidade posterior por isso, a posição dos isolados, inclusive do IP 146 representado como haplótipo único, não se mostrou confiável.

Os isolados reconhecidos como *M. anisopliae* s.l. formaram um clado monofilético bem suportado com dois grupos de haplótipos que apresentaram sequências idênticas aos isolados de referência ARSEF 7487 e ARSEF 6347, sendo referidos como Mani 1 (n=1) e Mani 2 (n=5), respectivamente. Mani 2 recebeu suporte significativo para “bootstrap” e probabilidade posterior. Por outro lado, Mani 1 apresentou suporte apenas para probabilidade posterior da Inferência Bayesiana.

Metarhizium sp. indet. 1 formou um grupo monofilético bem suportado e mostrou estar fortemente relacionado como grupo irmão de *M. anisopliae* entretanto, alguns subclados formados apresentaram baixos valores de “bootstrap” e inferência posterior. Sequências de isolados de *Metarhizium* sp. indet. 1 (n=21), recuperados em amostras de solo deste estudo, formaram quatro grupos de haplótipos sendo três haplótipos novos e o outro haplótipo apresentou sequências idênticas a dos isolados ESALQ 1638 e ESALQ 1639.

Isolados de *M. pingshaense* recuperados neste estudo formaram dois grupos de haplótipos, que se diferenciaram por apenas 1 par de base um do outro. O primeiro haplótipo apresentou sequências idênticas ao isolado CG1091 e o segundo foi um haplótipo novo com uma única sequência. CBS 258.90 formou um haplótipo adicional por apresentar dois pares de bases (pb) e dois “gaps” diferenciando-se das outras sequências. Este clado apresentou suporte significativo apenas para probabilidade posterior da Inferência Bayesiana.

Metarhizium sp. indet. 3 (n=2) formou um clado que recebeu forte suporte de “bootstrap” e probabilidade posterior, com as sequências agrupadas em um único haplótipo. O clado que une *Metarhizium* sp. indet. 3 com *M. guizhouense* não recebeu valores significativos de suporte das análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana e além disso, as sequências de *Metarhizium* sp. indet. 3 mostraram ser divergentes (diferindo em 9pb) daquela do CBS 258.90 (*M. guizhouense*).

Figura 4.4 – Árvore de Inferência Filogenética Bayesiana inferida do alinhamento de 108 sequências com a região nuclear 5'-TEF. Em negrito estão os isolados de referência, quinze foram provenientes do estudo de Rezende et al. (2015) onde aqueles que apresentam círculos rosa na frente indicam isolados recuperados de amostras de solo nos biomas brasileiros e aqueles com quadrado laranja se referem a isolados depositados na Coleção “Prof. Sérgio Batista Alves” de 1980 a 2012. Dezesesseis sequências, indicados com prefixo IP, são do estudo de Rocha et al. (2013) quinze sequências, com prefixo CG, são de Lopes et al. (2013a, 2013b e 2014) e os nove isolados indicados com uma estrela preta são taxonomicamente autenticados, ARSEF e CBS (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009). O suporte dos ramos foi representado pelo valor de probabilidade de Inferência Bayesiana (primeiro número) e porcentagem de 1000 réplicas de “bootstrap” derivadas da análise de máxima verossimilhança (segundo número)

4.4 Discussão

Os principais resultados deste estudo foram (1) a diversidade genética de *Metarhizium* spp. proveniente de amostras de solo de vegetação nativa foi maior do que a encontrada em cultivo anual e perene; (2) no bioma Amazônia foram encontrados haplótipos das seis linhagens encontradas neste estudo (*M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. pingshaense*, *Metarhizium* sp. indet. 1, *Metarhizium* sp. indet. 2 e *Metarhizium* sp. indet. 3); (3) *M. robertsii* foi encontrado nos três tipos de vegetação dos cinco biomas; (4) *Metarhizium* sp. indet. 1 apresentou a maior diversidade haplotípica dentre as linhagens estudadas e (5) uma nova linhagem, não caracterizada taxonomicamente, *Metarhizium* sp. indet. 3 foi encontrada predominantemente na Caatinga.

Isolados de *Metarhizium* spp. coletados em solo de vegetação nativa apresentaram diversidade haplotípica e nucleotídica superior à encontrada em cultivos anuais e perenes. O número de haplótipos obtidos na vegetação nativa foi 2,9 e 1,8 vezes maior do que no cultivo perene e anual, respectivamente. Além disso, 52% (21) do total de haplótipos obtidos, foram encontrados somente em vegetação nativa enquanto que, em cultivo anual e perene foram 6 e 3 haplótipos exclusivos dessas áreas, respectivamente. Bidochka et al. (2001) também mostraram uma associação de genótipos de *Metarhizium* spp. com áreas de vegetação nativa e áreas de cultivo agrícola, através da análises de polimorfismo por RAPD, RFLP e alozimas. Estudos têm demonstrado que este gênero além de ser abundante no solo também está associado à rizosfera de plantas (ST LEGER, 2008) sugerindo assim, que a maior diversidade obtida em áreas de vegetação nativa pode ser atribuída a maior diversidade de plantas e da fauna nestas áreas em comparação com os cultivos agrícolas.

Nas comparações entre os cultivos anuais e perenes a menor diversidade haplotípica e nucleotídica foi surpreendentemente encontrada entre os isolados coletados em solo de cana-de-açúcar onde 93% (n=40) das sequências representaram um único haplótipo (= *M. robertsii*). Isto contrasta com o fato de que *M. anisopliae* ocorre naturalmente infectando cigarrinha-da-raiz, *M. fimbriolata*, e é utilizado massalmente em canaviais de todo o Brasil como agente de controle biológico em áreas infestadas por essa praga, embora não se tem conhecimento do uso recente na área utilizada para estas coletas. Além disso, *M. anisopliae* foi a

espécie predominantemente encontrada em isolados de cigarrinhas (REZENDE et al., 2015) que é um inseto que passa parte do seu ciclo de vida no solo.

Análises de variância molecular indicaram que a variação é maior dentro do que entre cada ano, estação, método de isolamento, espécie de inseto usado no método “Insect bait”, em áreas com vegetação nativa e de cultivo anual. Altos e significativos valores de Φ_{st} (variando de 0,218 a 0,433) revelam um alto nível de diferenciação genética entre os isolados de *Metarhizium* spp deste estudo. O mesmo não foi observado para isolados do Chile, Holanda e países Asiáticos (China, Laos, Coréia do Sul, Singapore), onde baixos valores Φ_{st} indicaram pouca diferenciação genética entre os isolados quando microssatélites foram utilizados (FREED; JIN; REN, 2011; VELÁSQUEZ et al., 2007). Novos estudos deverão ser conduzidos para poder elucidar os altos valores de Φ_{st} encontrados neste estudo sendo necessário para isso, lançar mão de outros marcadores e técnicas moleculares.

Seis linhagens foram encontradas neste estudo: *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. pingshaense*, *Metarhizium* sp. indet. 1, *Metarhizium* sp. indet. 2 e *Metarhizium* sp. indet. 3. Amazônia foi o único bioma que apresentou haplótipos de todas estas linhagens e além disso foram constatados altos índices de diversidade entre os isolados provenientes de áreas com vegetação nativa e cultivos anual e perene. Estas observações corroboram a de outros estudos onde revelaram que este bioma abriga nos solos uma alta diversidade microbiana (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; MENDES et al., 2015; NAVARRETE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013).

M. robertsii foi a espécie mais abundante neste estudo, com haplótipos distribuídos em todos os tipos de vegetação dos cinco biomas brasileiros amostrados. Esta espécie também foi a predominante em solo do México (PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2014) e nos Estados Unidos (KEPLER et al., 2015). No Brasil, esta espécie não tem sido encontrada infectando insetos naturalmente, havendo poucos relatos de isolados provenientes de insetos em coleções de entomopatógenos (CENARGEN e ARSEF), sendo estes insetos de solo (LOPES et al., 2013a). *M. robertsii* apresenta uma ecologia fundamentalmente subterrânea (REZENDE et al., 2015) com diversos estudos demonstrando estar fortemente associada a raiz desempenhando um papel benéfico e potencializando o crescimento das plantas (BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015; SASAN; BIDOCHKA, 2012; WYREBEK et al., 2011) podendo, além disso, expressar diferentes genes na presença de exudatos da raiz, que contribuem para sua adesão à planta (BARELLI;

PADILLA-GUERRERO; BIDOCHKA, 2011; WANG; ST. LEGER, 2007). Na associação simbiótica entre *M. robertsii* e a planta, este fungo demonstrou ser capaz de translocar o nitrogênio derivado de cadáveres de insetos para a planta por meio da associação do seu micélio com a raiz (BEHIE; BIDOCHKA, 2014; BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012) e em troca utiliza o carbono que é exsudato da planta (FANG; ST LEGER, 2010). O papel que as plantas apresentam sobre a ecologia de *Metarhizium* em vegetação nativa e agroecossistemas tem sido alvo de diversas pesquisas (KEPLER et al., 2015) e por isso, investigações são necessárias para se entender se a presença deste fungo no solo, detectado em nosso estudo, pode estar relacionada à sua associação com plantas das áreas amostradas levando a um aumento na sua abundância. Quando reconstruímos a filogenia, a diversidade de haplótipos de *M. robertsii* com a região 5'-TEF foi semelhante ao encontrado no estudo de Rezende et al., (2015) exceto pela presença de um haplótipo único (ESALQ 2957) reconhecido somente em nosso estudo.

Metarhizium sp. indet. 1 foi a segunda espécie mais abundante neste estudo sendo verificada em 12,5% das 303 sequências. Foi a linhagem que apresentou a maior diversidade haplotípica indicando com isso, a grande variação existente entre os poucos isolados analisados. Curiosamente, todos os haplótipos desta linhagem isolados do solo dos três tipos de vegetação no Cerrado foram diferentes daqueles obtidos nos três tipos de vegetação na Amazônia, com exceção de um haplótipo. Esta é a primeira vez que haplótipos de *Metarhizium* sp. indet. 1 foram relatados em solo na Amazônia e em cultivos agrícolas no Cerrado. Nos estudos realizados por Rocha et al. (2013) e Rezende et al. (2015), utilizando a região 5'-TEF, esta linhagem foi encontrada apenas em solo de vegetação nativa no Estado de Goiás que compreende na sua maior área o bioma Cerrado. Rezende et al. (2015) mencionaram, inclusive, que este táxon poderia apresentar uma exigência ecológica por ambientes não antropizados. Entretanto, nosso estudo mostrou que esta linhagem também pode ocorrer em solos com cultivos onde diferentes práticas agrícolas são empregadas. Quando reconstruímos a filogenia com a região 5'-TEF observamos que, conforme mencionado no estudo de Lopes et al. (2014), os isolados CG814, CG835 e CG1233 correspondem a *Metarhizium* sp. indet. 1. O isolado CG1233 foi obtido de adultos de *Phyllophaga capillata* em campos de soja no estado de Goiás (LOPES et al., 2013a) o que reforça a idéia de que esta linhagem está associada tanto ao solo de vegetação nativa e cultivos agrícolas

quanto infectando insetos presentes nessas áreas. A posição filogenética de *Metarhizium* sp. indet. 1 como grupo irmão de *M. anisopliae* concorda com os resultados obtidos por Rezende et al. (2015) porém, um número maior de isolados é necessário, para se determinar com confiança a posição de alguns isolados dentro dos subclados devido aos baixos valores de “bootstrap” e inferência posterior Bayesiana.

M. anisopliae foi a terceira espécie mais abundante o que contrasta com outros estudos conduzidos no Brasil. Haplótipos de *M. anisopliae* foram detectados ocorrendo com frequência semelhante aos haplótipos de *M. robertsii* em solo de cultivos e vegetação nativa na Caatinga e superior em vegetação nativa na Mata Atlântica, sendo que na Caatinga foi detectado um único haplótipo de *M. anisopliae*. Nos solos de cultivos na Amazônia e Cerrado e vegetação nativa na Amazônia também foram encontrados haplótipos desta espécie porém, numa frequência significativamente menor. Segundo Rezende et al. (2015) *M. anisopliae* s.l. (Mani 2) apresenta ampla distribuição geográfica, infectando insetos de uma variedade de habitats originados de uma área que corresponde aproximadamente 2/3 do Brasil. Além disso, esta linhagem também foi constatada ocorrendo em amostras de solo dos diversos cultivos e áreas de vegetação nativa o que demonstra sua versatilidade em coordenar ambas as funções ecológicas. Os haplótipos revelados utilizando a região 5'-TEF se agruparam a dois clados de *M. anisopliae* s.l. (Mani 1 e Mani 2) nos quais apresentam sequências de referencia ARSEF reconhecidas por Bischoff, Rehner e Humber (2009).

Os dois únicos haplótipos de *M. pingshaense*, obtidos com a região intergênica MzIGS3, foram encontrados em solo de cultivo de banana, na Amazônia, nos dois anos, nas duas estações, nos dois métodos e nas duas espécies de insetos utilizadas no “Insect bait”. Nas áreas com milho e feijão na Amazônia e Caatinga, respectivamente, e vegetação nativa dos biomas Caatinga e Mata Atlântica *M. pingshaense* foi representado por um único haplótipo. O baixo valor de diversidade nucleotídica desta espécie pode estar associado a transição (substituição de bases purina) ocorrido em apenas um par de base. *M. pingshaense* já foi relatada anteriormente no Brasil infectando *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) em banana porém, este é o primeiro relato de ocorrência de haplótipos desta espécie em solo associados a outros cultivos especialmente em áreas na Caatinga e Mata Atlântica. A ocorrência desta espécie já foi registrada em

solo no Japão (NISHI et al., 2011) ou infectando larvas de coleópteras no México (CARRILLO-BENÍTEZ et al., 2013) e Vietnã (CITO et al., 2014). Quando a região 5'-TEF foi sequenciada, os haplótipos reconhecidos neste estudo foram irmãos do único haplótipo representado pela sequência de referência CBS 258.90.

Uma nova linhagem foi referida como *Metarhizium* sp. indet. 3 sendo representada por apenas um haplótipo e por isso, não teve seus índices de diversidade calculados. Este haplótipo ocorreu majoritariamente (85,7%) no solo de vegetação nativa na Caatinga sendo três isolados recuperados com *G. mellonella* e três com *T. molitor*. O único isolado (ESALQ 4684) representante deste haplótipo em área de vegetação nativa na Amazônia foi detectado no solo utilizando meio seletivo ("PDAY"). De acordo com o contexto filogenético gerado a partir de sequências com a região 5'-TEF, a posição do clado formado por esses isolados na árvore indica que esta nova linhagem pode pertencer ao clado MGT. Este seria o segundo registro de uma nova linhagem no clado MGT ocorrendo no Brasil sendo o primeiro do isolado ESALQ 1636 (*Metarhizium* sp. indet. 2) que foi isolado em solo de vegetação nativa na Amazônia (REZENDE et al., 2015). A adição de mais isolados desta linhagem são necessários para determinar com confiança sua posição filogenética e outros estudos taxonômicos e ecológicos devem ser realizados para poder confirmar se representam um novo táxon.

Nas análises de diversidade genética com os 303 isolados brasileiros provenientes de solo, utilizando MzIGS3, 40 haplótipos foram detectados, dos quais 27 ainda não foram reportados na literatura. Rezende et al. (2015) analisaram as espécies de *Metarhizium* spp. presentes em 96 isolados da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos "Prof. Sérgio Batista Alves" da ESALQ-USP na maioria isolados de insetos infectados e encontraram 17 haplótipos, sendo somente 7 provenientes de insetos. Com isso, observamos que existe uma maior diversidade nos isolados obtidos do solo quando comparado aos isolados provenientes de insetos. Isto pode ser observado também com o estudo de Yanaka-Schäfer et al. (2008) onde os autores, analisando a região IGS do gene rDNA de 21 isolados de inseto e 6 do solo provenientes de diferentes coleções de entomopatógenos no Brasil, detectaram que a diversidade nucleotídica ($\pi=0,016$) foi inferior à obtido em nosso estudo ($\pi=0,025$) onde os isolados foram todos provenientes do solo.

Neste estudo foi revelado que *M. robertsii* é a espécie mais abundante nos solos brasileiros ocorrendo em todos os tipos de vegetação enquanto que, outras

linhagens estiveram mais relacionadas a um tipo específico de vegetação sendo necessárias novas investigações para se entender a relação ecológica que estes fungos apresentam nos diferentes solos incluindo a associação com as raízes de plantas. O conhecimento gerado neste estudo sobre diversidade e distribuição dos haplótipos de *Metarhizium* spp. em solo poderá servir de subsídio para maximização do seu uso como agente no controle biológico de importantes pragas agrícolas minimizando consequentemente, os impactos ambientais ocasionados pela aplicação de produtos químicos.

Referências

- ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMAI, M.A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 69-110.
- BARELLI, L.; PADILLA-GUERRERO, I.E.; BIDOCHKA, M.J. Differential expression of insect and plant specific adhesin genes, Mad1 and Mad2, in *Metarhizium robertsii*. **Fungal Biology**, Oxford, v. 115, n. 11, p. 1174–1185, 2011.
- BEHIE, S.W.; BIDOCHKA, M.J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: An additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 5, p. 1553–1560, 2014.
- BEHIE, S.W.; JONES, S.J.; BIDOCHKA, M.J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecology**, Manchester, v. 13, p. 112–119, 2015.
- BEHIE, S.W.; ZELISKO, P.M.; BIDOCHKA, M.J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, New York, v. 336, n. 6088, p. 1576–1577, 2012.
- BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; DE CROOS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1335–1342, 2001.
- BIDOCHKA, M.J.; McDONALD, M.A.; St. LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, New York, v. 25, n. 2, p. 107–113, 1994.
- BIDOCHKA, M.; SMALL, C.L.N.; MICHAEL, S. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1361–1368, 2005.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 5, p. 737–745, 2006.

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.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2647–2653, 1997.

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

CHRISTENSEN, M. A View of Fungal Ecology. **Mycologia**, New York, v. 81, n. 1, p. 1–19, 1989.

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

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.

COUTINHO, L.M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 13–23, 2006.

CRANDALL, K. A.; TEMPLETON, A.R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. **Genetics**, Bethesda, v. 134, n. 3, p. 959–969, 1993.

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

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.

ENKERLI, J.; GHORMADE, V.; OULEVEY, C.; WIDMER, F. PCR-RFLP analysis of chitinase genes enables efficient genotyping of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 102, n. 2, p. 185–188, 2009.

ENKERLI, J.; WIDMER, F. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 17–37, 2010.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

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.

FANG, W.; ST LEGER, R.J. Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 154, n. 3, p. 1549–1557, 2010.

FEGAN, M.; MANNERS, J.M.; MACLEAN, D.J.; IRWIN, J.A.G.; SAMUELS, K.D.Z.; HOLDOM, D.G.; LI, D.P. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 139, n. 9, p. 2075–2081, 1993.

FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.N.; FOSTER, N.R.; ROBERTS, D.W. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, Orlando, v. 54, n. 3, p. 197–205, 2010.

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

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, 2011.

HAJEK, A.E.; ST. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 39, p. 293–322, 1994.

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.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2004. **Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil**. Disponível em: <
<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>.
Acesso em: 25 fev. 2015.

INGLIS, G.D.; DUKE, G.M.; GOETTEL, M.S.; KABALUK, J.T. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, n. 1, p. 101–113, 2008.

KEPLER, R.M.; HUMBER, R.A.; BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, New York, v. 106, n. 4, p. 811–829, 2014.

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, 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.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BUTT, T.M.; PEBERDY, J.F. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 9, p. 1077–1081, 1994.

LELES, R.N.; SOUSA, N.A.; ROCHA, L.F.N.; SANTOS, A.H.; SILVA, H.H.G.; LUZ, C. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 5, p. 1271–1274, 2010.

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.

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

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 commercial banana field and their virulence toward *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Fungal Ecology**, Manchester, v. 6, n. 5, p. 356–364, 2013b.

LOPES, R.B.; FARIA, M.; SOUZA, D.A.; BLOCH, C.; SILVA, L.P.; HUMBER, R.A. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. **Mycologia**, New York, v. 106, n. 4, p. 865–878, 2014.

LUAN, F.; ZHANG, S.; WANG, B.; HUANG, B.; LI, Z. Genetic diversity of the fungal pathogen *Metarhizium* spp., causing epizootics in Chinese burrower bugs in the Jingting Mountains, eastern China. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 40, n. 1, p. 515–523, 2013.

LUZ, C.; TAI, M.H.H.; SANTOS, A.H.; ROCHA, L.F.N.; ALBERNAZ, D.A.S.; SILVA, H.H.G. Ovicidal Activity of Entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) Under Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 44, n. 5, p. 799–804, 2007.

LUZ, C.; TAI, M.H.H.; SANTOS, A.H.; SILVA, H.H.G. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p. 214–215, 2008.

LUZ, C.; ROCHA, L.; NERY, G. Detection of Entomopathogenic Fungi in Peridomestic Triatomine-Infested Areas in Central Brazil and Fungal Activity Against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 783–791, 2004.

MENDES, L.W.; TSAI, S.M.; NAVARRETE, A.A.; DE HOLLANDER, M.; VEEN, J.A. van; KURAMAE, E.E. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, New York, 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.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 43, n. 2, p. 145–155, 2007.

MEYLING, N.V.; THORUP-KRISTENSEN, K.; EILENBERG, J. Below and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. **Biological Control**, Orlando, v. 59, n. 2, p. 180–186, 2011.

Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Biomass**. 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomass>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

MNYONE, L.L.; RUSSELL, T.L.; LYIMO, I.N.; LWETOIJERA, D.W.; KIRBY, M.J.; LUZ, C. First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. and *An. arabiensis* (Diptera; Culicidae). **Parasites & Vectors**, London, v. 2, n. 1, p. 59–62, 2009.

MITTERMEIER, R.A.; da FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. A Brief History of Biodiversity Conservation in Brazil. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 601–607, 2005.

NAVARRETE, A.A.; CANNAVAN, F.S.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity**, Bethesda, v. 2, n. 5, p. 787–809, 2010.

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

NISHI, O.; HASEGAWA, K.; IIYAMA, 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.

PÉREZ-GONZÁLEZ, V.H.; GUZMÁN-FRANCO, A.W.; ALATORRE-ROSAS, R.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A.; CARRILLO-BENÍTEZ, M.G.; BAVERSTOCK, J. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 119, p. 54–61, 2014.

PIPE, N.D.; CHANDLER, D.; BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 4, p. 485–491, 1995.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, Chigago, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.

RAMBAUT, A. Tree Figure Drawing Tool v.1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2006-2009. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/figtree>>. Acesso em: 06 Jan. 2015.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; DRUMMOND, A.J. TRACER: **MCMC Trace Analysis** Tool Version v.1.6. University of Oxford, Oxford, 2014. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>>. Acesso em: 05 Jan. 2015.

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.

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.

ROCHA, L.F.N.; INGLIS, P.W.; HUMBER, R.A.; KIPNIS, A.; LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, n. 3, p. 251–259, 2013.

ROCHA, L. F. N.; LUZ, C. Activity of *Metarhizium* spp. and *Isaria* spp. from the Central Brazilian Cerrado against *Triatoma infestans* nymphs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, n. 7, p. 417–419, 2011.

RODDAM, L.; RATH, A. Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 69, p. 285–288, 1997.

RODRIGUES, J.L.M.; PELLIZARI, V.H.; MUELLER, R.; BAEK, K.; JESUS, E.C.; PAULA, F.S.; MIRZA, B.; HAMAOU, G.S.; TSAI, S.M.; FEIGL, B.; TIEDJE, J.M.; BOHANNAN, B.J.M.; NÜSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P. VAN DER; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

SANTOS, A.H.; TAI, M.H.H.; ROCHA, L.F.N.; SILVA, H.H.G.; LUZ, C. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**, Orlando, v. 50, n. 1, p. 37–42, 2009.

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. 101–107, 2012.

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

SOSA-GÓMEZ, D.R.; HUMBER, R.A.; HODGE, K.T.; BINNECK, E.; SILVA-BRANDÃO, K.L.D. Variability of the mitochondrial SSU rDNA of *Nomuraea* species and other entomopathogenic fungi from Hypocreales. **Mycopathologia**, Holanda, v. 167, n. 3, p. 145–154, 2009.

ST LEGER, R.J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, n. 3, p. 271–276, 2008.

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.; MEYLING, N.V. Molecular diversity of the *Metarhizium anisopliae* lineage in an agricultural field. **International Organisation for Biological Control Bulletin**, Waedenswil, v. 66, p. 113–115, 2011.

STEINWENDER, B.M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; THORUP-KRISTENSEN, 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.

SUNG, G.H.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 57, p. 5–59, 2007.

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.

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.

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

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.

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.

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

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

YANAKA-SCHÄFER, F.Y.; DALL'ONDER, L.P.; PANICHI, M.C.; MENDES, R.G.; FAGUNDES, N.J.R.; BANDINELLI, J.B.; BOGO, M.R. Sequence analysis of the rDNA intergenic spacer of *Metarhizium* strains isolated in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 116–121, 2008.

Anexo

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continua)

Espécie	Código^a	H^b	Bioma^c	Vegetação	Data	Método^d	Latitude	Longitude	Local^g
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3969	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	IBT	11 52'3,95"S	55 23'8,76"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3229	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	IBG	11 51'6,38"S	55 22'7,40"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3972	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	IBT	11 53'4,42"S	55 23'6,37"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3973	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	IBT	11 51'6,59"S	55 22'7,55"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3231	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	IBG	11 52'3,95"S	55 23'8,76"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3226	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	IBG	11 49'7,20"S	55 22'2,22"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4924	3	AMA	Veg. nativa	12/03/2012	IBT	11 52'3,98"S	55 23'8,87"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4791	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	MS/P	11 52'4,10"S	55 23'8,80"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4794	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	MS/P	11 53'4,31"S	55 23'6,43"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4796	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	MS/P	11 49'7,11"S	55 22'2,33"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3708	2	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	IBG	11 53'4,31"S	55 23'6,43"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2753	2	AMA	Banana	31/07/2012	IBG	11 56'2,51"S	55 29'0,43"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4181	3	AMA	Banana	09/03/2013	IBG	11 54'6,01"S	55 29'8,17"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4311	24	AMA	Banana	09/03/2013	MS/P	11 54'3,21"S	55 29'2,34"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4307	2	AMA	Banana	09/03/2013	MS/P	11 54'6,05"S	55 29'8,05"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4853	2	AMA	Banana	09/03/2013	IBT	11 56'2,51"S	55 29'0,43"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1915	3	AMA	Banana	06/03/2012	IBG	11 56'1,16"S	55 29'4,23"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1918	3	AMA	Banana	06/03/2012	IBG	11 54'6,01"S	55 29'8,17"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2364 ^h	16	AMA	Banana	31/07/2012	IBG	11 56'1,09"S	55 29'4,15"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2966 ^h	2	AMA	Milho	14/08/2012	MS/P	11 51'7,28"S	55 22'6,25"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3165	2	AMA	Milho	05/09/2013	IBG	11 51'7,28"S	55 22'6,25"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3348	2	AMA	Milho	05/09/2013	IBG	11 52'6,87"S	55 22'6,47"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4406	2	AMA	Milho	05/09/2013	IBT	11 50'9,14"S	55 22'1,20"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4399	2	AMA	Milho	05/09/2013	IBT	11 51'7,18"S	55 22'6,34"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4403	2	AMA	Milho	05/09/2013	IBT	11 52'6,87"S	55 22'6,52"W	Sinop/MT

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código^a	H^b	Bioma^c	Vegetação	Data	Método^d	Latitude	Longitude	Local^g
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1621	2	AMA	Milho	20/03/2012	MS/P	11 51'7,27"S	55 22'6,36"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2409	2	AMA	Milho	14/08/2012	IBG	11 51'7,22"S	55 22'6,25"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4927	3	AMA	Milho	20/03/2012	IBT	11 52'6,87"S	55 22'6,52"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4638	2	AMA	Milho	05/09/2013	MS/P	11 52'6,98"S	55 22'6,48"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1890	2	AMA	Milho	20/03/2012	IBG	11 52'6,87"S	55 22'6,47"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1891	3	AMA	Milho	20/03/2012	IBG	11 51'1,29"S	55 22'6,77"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2412	2	AMA	Milho	14/08/2012	IBG	11 50'9,13"S	55 22'1,15"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1887	5	AMA	Milho	20/03/2012	IBG	11 50'9,12"S	55 22'1,24"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2801	2	AMA	Milho	20/03/2012	IBT	11 51'7,22"S	55 22'6,25"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4409	2	AMA	Milho	05/09/2013	IBT	11 51'1,38"S	55 22'6,69"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3984 ^h	3	CAA	Veg. nativa	09/04/2013	IBT	9 24'1,40"S	37 58'2,40"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3745	3	CAA	Veg. nativa	09/04/2013	IBG	9 24'0,65"S	37 58'3,30"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3980	3	CAA	Veg. nativa	09/04/2013	IBT	9 25'8,99"S	37 57'7,38"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3743	3	CAA	Veg. nativa	09/04/2013	IBG	9 25'5,14"S	37 57'4,34"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1747	34	CAA	Veg. nativa	21/08/2012	MS/P	9 24'5,84"S	37 58'2,64"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2191	3	CAA	Veg. nativa	21/03/2012	IBG	9 24'5,75"S	37 58'2,86"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3926	2	CAA	Palma	09/04/2013	IBG	9 25'51,8"S	37 57'36,2"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3125	2	CAA	Palma	09/04/2013	IBT	9 25'51,8"S	37 57'36,2"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3927	2	CAA	Palma	09/04/2013	IBG	9 24'9,17"S	37 58'52,4"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1933	2	CAA	Feijão	21/08/2012	IBT	9 26'3,96"S	37 57'1,09"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2219	2	CAA	Feijão	21/08/2012	IBG	9 26'3,89"S	37 57'1,26"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1935	2	CAA	Feijão	21/08/2012	IBT	9 25'4,42"S	37 57'5,37"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1932	2	CAA	Feijão	21/08/2012	IBT	9 26'8,13"S	37 57'2,09"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2001	2	CAA	Feijão	21/08/2012	IBG	9 25'4,65"S	37 57'5,32"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2985	2	CER	Veg. nativa	05/09/2012	IBT	17 29'48,4"S	51 13'40,9"W	Rio Verde/GO

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código^a	H^b	Bioma^c	Vegetação	Data	Método^d	Latitude	Longitude	Local^g
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3725	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	IBT	17 29'48,4"S	51 13'41,0"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2746	2	CER	Veg. nativa	27/03/2012	IBG	17 29'50,0"S	51 11'49,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3918	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	IBG	17 30'09,4"S	51 13'35,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3912	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	IBG	17 29'49,4"S	51 13'40,8"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2786 ^h	16	CER	Veg. nativa	05/09/2012	MS/P	17 29'50,2"S	51 13'40,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3362	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	IBT	17 30'08,4"S	51 13'36,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3625	2	CER	Veg. nativa	04/06/2013	IBT	17 29'50,8"S	51 13'32,0"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3111	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	IBT	17 29'50,4"S	51 13'30,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3647	2	CER	Veg. nativa	04/06/2013	IBG	17 29'48,4"S	51 13'41,0"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3711 ^h	20	CER	Veg. nativa	04/06/2013	IBT	17 29'51,4"S	51 13'39,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4553	2	CER	Veg. nativa	04/06/2013	MS/C	17 29'49,7"S	51 13'31,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3921	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	IBG	17 29'51,1"S	51 13'31,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3114	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	IBT	17 30'05,7"S	51 13'41,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4584	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	MS/P	17 29'48,9"S	51 13'41,0"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4599	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	MS/P	17 29'51,1"S	51 13'31,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2044	2	CER	Veg. nativa	27/03/2012	IBT	17 29'59,3"S	51 13'42,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3917	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	IBG	17 30'05,3"S	51 13'42,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4590	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	MS/P	17 30'05,7"S	51 13'41,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4595	2	CER	Veg. nativa	30/01/2013	MS/P	17 30'08,8"S	51 13'35,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2025	2	CER	Veg. nativa	27/03/2012	MS/P	17 29'51,0"S	51 13'31,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2391	2	CER	Veg. nativa	05/09/2012	IBG	17 29'49,7"S	51 13'40,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2068	2	CER	Veg. nativa	27/03/2012	IBT	17 29'51,0"S	51 13'31,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2750	2	CER	Veg. nativa	05/09/2012	IBT	17 29'51,4"S	51 13'31,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3748	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	IBG	17 26'14,2"S	51 38'10,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3749	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	IBG	17 25'01,6"S	51 38'15,1"W	Rio Verde/GO

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código^a	H^b	Bioma^c	Vegetação	Data	Método^d	Latitude	Longitude	Local^g
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2988	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	IBT	17 26'15,4"S	51 38'03,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2790	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	IBT	17 26'15,3"S	51 38'02,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2976	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	MS/P	17 26'14,3"S	51 38'01,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2962	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	MS/P	17 25'43,5"S	51 38'47,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2759	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	IBG	17 25'03,6"S	51 38'16,0"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2843	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	MS/P	17 25'00,8"S	51 38'14,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2149	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	IBG	17 30'38,9"S	51 14'17,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4413	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	IBT	17 26'13,7"S	51 38'02,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4424	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	IBT	17 25'01,1"S	51 38'14,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4418	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	IBT	17 26'14,5"S	51 38'09,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4354	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	IBG	17 26'04,9"S	51 38'44,8"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4375	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	IBG	17 26'15,3"S	51 38'02,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4368 ^h	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	IBG	17 25'02,2"S	51 38'15,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4161	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	IBT	17 26'04,8"S	51 38'43,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4323	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	MS/P	17 25'43,9"S	51 38'47,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4321	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	MS/P	17 26'14,0"S	51 38'02,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4420	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	IBT	17 25'41,9"S	51 38'46,0"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4155	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	IBT	17 26'15,3"S	51 38'02,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2842	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	MS/P	17 26'12,7"S	51 38'10,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4168	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	IBT	17 26'04,8"S	51 38'41,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4689	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	MS/P	17 30'21,8"S	51 14'27,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4780	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	MS/P	17 30'37,1"S	51 13'46,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4777	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	MS/C	17 30'21,5"S	51 14'27,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4715	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	MS/P	17 25'00,8"S	51 38'14,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4712	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	MS/P	17 26'04,9"S	51 38'43,8"W	Rio Verde/GO

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código^a	H^b	Bioma^c	Vegetação	Data	Método^d	Latitude	Longitude	Local^g
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4859	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	IBG	17 25'42,6"S	51 38'46,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2128	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	IBG	17 30'22,3"S	51 14'28,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2795	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	IBT	17 26'13,5"S	51 38'03,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4709	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	MS/P	17 26'16,1"S	51 38'02,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4714	2	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	MS/P	17 25'42,6"S	51 38'46,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4857	2	CER	Cana-de-açúcar	03/06/2013	IBG	17 26'14,7"S	51 38'02,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1987	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	IBT	17 30'22,9"S	51 14'27,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2140	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	IBG	17 31'32,4"S	51 14'30,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2421	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	IBG	17 26'14,3"S	51 38'01,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2413	2	CER	Cana-de-açúcar	03/10/2012	IBG	17 26'12,9"S	51 38'09,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1988	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	IBT	17 30'36,9"S	51 13'48,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2130	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	IBG	17 30'36,9"S	51 14'22,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2232	2	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	IBT	17 31'32,6"S	51 14'31,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2559	2	CER	Milho	04/09/2012	MS/C	17 30'37,5"S	51 14'16,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3253	2	CER	Milho	04/06/2013	IBT	17 30'18,5"S	51 15'04,8"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3642	2	CER	Milho	04/06/2013	IBG	17 30'18,5"S	51 15'04,8"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3718	2	CER	Milho	04/06/2013	IBG	17 31'04,8"S	51 16'22,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3256	2	CER	Milho	04/06/2013	IBT	17 30'22,0"S	51 16'10,8"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3716	2	CER	Milho	04/06/2013	IBG	17 30'28,9"S	51 16'36,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1952	2	CER	Milho	27/03/2012	IBT	17 30'18,2"S	51 14'36,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2450 ^h	23	CER	Milho	04/09/2012	IBT	17 30'37,3"S	51 13'39,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1624	2	CER	Milho	27/03/2012	MS/P	17 30'18,2"S	51 14'37,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4932	2	CER	Milho	27/03/2012	MS/P	17 30'26,2"S	51 14'11,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4933	2	CER	Milho	27/03/2012	MS/P	17 30'37,3"S	51 13'41,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4327	2	CER	Milho	27/03/2012	MS/P	17 30'37,4"S	51 14'17,1"W	Rio Verde/GO

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código^a	H^b	Bioma^c	Vegetação	Data	Método^d	Latitude	Longitude	Local^g
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2461	2	CER	Milho	04/09/2012	IBT	17 30'18,4"S	51 14'36,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4753	2	CER	Milho	04/06/2013	MS/P	17 30'18,5"S	51 15'03,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4750	2	CER	Milho	04/06/2013	MS/P	17 30'22,1"S	51 16'12,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2439	2	CER	Milho	04/09/2012	IBG	17 30'27,1"S	51 14'09,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2445	2	CER	Milho	04/09/2012	IBG	17 30'37,3"S	51 13'40,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1967	2	CER	Milho	27/03/2012	IBT	17 30'37,7"S	51 14'16,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2213	2	CER	Milho	27/03/2012	IBG	17 30'37,7"S	51 14'16,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1959	2	CER	Milho	27/03/2012	IBT	17 30'26,6"S	51 14'10,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4748	2	CER	Milho	04/06/2013	MS/P	17 31'04,7"S	51 16'21,8"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4747	2	CER	Milho	04/06/2013	MS/P	17 30'28,2"S	51 16'36,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2555	2	CER	Milho	04/09/2012	MS/P	17 30'37,0"S	51 13'42,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2300	2	CER	Milho	27/03/2012	IBG	17 30'37,1"S	51 13'39,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2080	2	CER	Milho	27/03/2012	IBG	17 30'18,7"S	51 14'34,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1958	2	CER	Milho	27/03/2012	IBT	17 30'37,3"S	51 13'40,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3255	2	CER	Milho	04/06/2013	IBT	17 30'29,3"S	51 16'36,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2461	2	CER	Milho	04/09/2012	IBT	17 30'18,4"S	51 14'36,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2442	2	CER	Milho	04/09/2012	IBG	17 30'36,9"S	51 14'17,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2091	2	CER	Milho	27/03/2012	IBG	17 30'26,2"S	51 14'11,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3248	2	CER	Milho	04/06/2013	IBT	17 31'04,7"S	51 16'24,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2561	2	CER	Milho	04/09/2012	MS/P	17 30'27,1"S	51 14'09,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2455	2	CER	Milho	04/09/2012	IBT	17 30'35,3"S	51 14'17,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2443	2	CER	Milho	04/09/2012	IBG	17 30'18,1"S	51 14'37,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3641	2	CER	Milho	04/06/2013	IBG	17 30'22,0"S	51 16'10,8"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4818	2	CER	Soja	30/01/2013	MS/P	17 30'26,5"S	51 14'11,0"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4814	2	CER	Soja	30/01/2013	MS/P	17 30'15,1"S	51 14'37,1"W	Rio Verde/GO

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código ^a	H ^b	Bioma ^c	Vegetação	Data	Método ^d	Latitude	Longitude	Local ^g
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3729	2	CER	Soja	30/01/2013	IBG	17 30'18,3"S	51 14'36,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3964 ^h	6	MAT	Veg. nativa	06/09/2013	IBT	9 51'7,42"S	36 20'3,06"W	T. Vilela/AL ^f
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3959	6	MAT	Veg. nativa	06/09/2013	IBT	9 52'4,96"S	36 20'1,87"W	T. Vilela/AL ^f
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2956	16	MAT	Veg. nativa	14/03/2012	MS/P	9 52'4,54"S	36 19'8,56"W	T. Vilela/AL ^f
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2957 ^h	5	PAM	Veg. nativa	26/06/2012	MS/P	31 41'53,4"S	54 13'39,3"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2752	3	PAM	Veg. nativa	26/06/2012	MS/P	31 42'1,9"S	54 14'8,7"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3929	3	PAM	Veg. nativa	20/08/2013	IBT	31 42'1,4"S	54 14'9,0"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3158	3	PAM	Veg. nativa	20/08/2013	IBG	31 41'38,4"S	54 14'17,2"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2973	3	PAM	Veg. nativa	26/06/2012	IBG	31 41'53,4"S	54 13'39,3"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2960 ^h	3	PAM	Veg. nativa	26/06/2012	MS/P	31 41'29,3"S	54 13'45,2"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3127	3	PAM	Veg. nativa	20/08/2013	IBG	31 41'52,2"S	54 13'38,7"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3151 ^h	14	PAM	Veg. nativa	20/08/2013	IBG	31 41'28,8"S	54 13'44,8"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3149 ^h	18	PAM	Veg. nativa	20/08/2013	IBG	31 42'1,9"S	54 14'8,7"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2486 ^h	19	PAM	Veg. nativa	26/06/2012	IBT	31 42'1,5"S	54 14'9,8"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2493	3	PAM	Veg. nativa	26/06/2012	IBT	31 41'53,1"S	54 13'38,7"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4189	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	IBT	31 42'02,2"S	54 14'07,7"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4200	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	IBT	31 41'32,4"S	54 13'45,4"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4718	3	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	IBT	31 41'53"S	54 13'39,8"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4622	3	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	IBG	31 42'1,4"S	54 14'9,0"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4629 ^h	22	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	IBG	31 41'38,3"S	54 14'17,8"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4630	3	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	IBG	31 41'29,3"S	54 13'45,2"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1620	22	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	MS/P	31 42'1,4"S	54 14'9,0"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1619	3	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	MS/P	31 41'29,6"S	54 13'44,7"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4194	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	IBT	31 41'37,3"S	54 14'14,0"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3936	3	PAM	Veg. nativa	20/08/2013	IBT	31 41'38,8"S	54 14'17,5"W	Aceguá/RS

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código ^a	H ^b	Bioma ^c	Vegetação	Data	Método ^d	Latitude	Longitude	Local ^g
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4125	5	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	IBG	31 41'37,4"S	54 14'14,8"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4117	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	IBG	31 42'01,7"S	54 14'08,5"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4130	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	IBG	31 41'32,2"S	54 13'45,8"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4120	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	IBG	31 41'59,8"S	54 13'36,5"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4917 ^h	22	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	IBT	31 42'1,4"S	54 14'9,0"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4918	3	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	IBT	31 41'38,7"S	54 14'18,9"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4919	3	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	IBT	31 41'29,3"S	54 13'45,2"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4930 ^h	3	PAM	Veg. nativa	05/03/2012	MS/C	31 41'38,5"S	54 14'18,4"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4674	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	MS/P	31 41'32,0"S	54 13'45,8"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4669	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	MS/P	31 42'02,2"S	54 14'07,7"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4339	3	PAM	Veg. nativa	20/08/2013	MS/P	31 42'1,4"S	54 14'9,0"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4672	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	MS/P	31 41'59,8"S	54 13'36,5"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4192	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	IBT	31 41'59,2"S	54 13'37,6"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 3943	3	PAM	Veg. nativa	20/08/2013	IBT	31 41'29,6"S	54 13'44,7"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2316	3	PAM	Veg. nativa	26/06/2012	IBG	31 42'1,9"S	54 14'8,7"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2322	22	PAM	Veg. nativa	26/06/2012	IBG	31 41'38,8"S	54 14'18,3"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 2326	3	PAM	Veg. nativa	26/06/2012	IBG	31 41'28,8"S	54 13'44,4"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 4677	3	PAM	Veg. nativa	16/04/2013	MS/C	31 41'59,8"S	54 13'36,5"W	Aceguá/RS
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4844	9	AMA	Veg. nativa	12/03/2012	IBG	11 51'6,48"S	55 22'7,52"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4926	15	AMA	Veg. nativa	12/03/2012	IBT	11 51'6,49"S	55 22'7,47"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4797	15	AMA	Veg. nativa	16/03/2013	MS/P	11 51'6,38"S	55 22'7,40"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 2362 ^h	15	AMA	Veg. nativa	07/08/2012	IBT	11 52'3,98"S	55 23'8,87"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4090	15	AMA	Banana	13/09/2013	IBT	11 56'1,16"S	55 29'4,23"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 2787 ^h	9	AMA	Banana	31/07/2012	MS/P	11 54'6,01"S	55 29'8,17"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4920	15	AMA	Banana	06/03/2012	IBT	11 56'1,16"S	55 29'4,23"W	Sinop/MT

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código ^a	H ^b	Bioma ^c	Vegetação	Data	Método ^d	Latitude	Longitude	Local ^g
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 3167 ^h	9	AMA	Milho	05/09/2013	IBG	11 51'1,40"S	55 22'6,65"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4133	15	AMA	Milho	23/03/2013	IBG	11 51'7,28"S	55 22'6,25"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4928	9	AMA	Milho	20/03/2012	IBT	11 51'1,40"S	55 22'6,65"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4931	9	AMA	Milho	20/03/2012	MS/P	11 51'1,29"S	55 22'6,77"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4266	15	CAA	Veg. nativa	10/09/2013	MS/C	9 25'5,10"S	37 57'4,40"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4265	15	CAA	Veg. nativa	10/09/2013	MS/P	9 24'0,70"S	37 58'1,22"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4258	15	CAA	Veg. nativa	10/09/2013	MS/P	9 25'8,73"S	37 57'7,57"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4267	15	CAA	Veg. nativa	10/09/2013	MS/C	9 24'06,1"S	37 58'1,24"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 1816	15	CAA	Veg. nativa	21/08/2012	IBT	9 25'0,35"S	37 57'8,29"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 1813	15	CAA	Veg. nativa	21/08/2012	IBT	9 24'5,80"S	37 58'2,78"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 1814	15	CAA	Veg. nativa	21/08/2012	IBT	9 25'0,35"S	37 57'8,29"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4331	15	CAA	Palma	10/09/2013	MS/P	9 24'45,3"S	37 57'49,5"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 1793	15	CAA	Palma	13/08/2012	IBT	9 26'6,68"S	37 56'2,74"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 1791	15	CAA	Palma	13/08/2012	IBT	9 24'7,94"S	37 57'8,40"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4581	15	CAA	Feijão	09/04/2013	MS/C	9 24'5,57"S	37 58'3,35"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4729	15	CAA	Feijão	10/09/2013	MS/P	9 24'6,12"S	37 58'1,87"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4725	15	CAA	Feijão	10/09/2013	MS/P	9 25'2,57"S	37 57'3,09"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4580	15	CAA	Feijão	09/04/2013	MS/P	9 26'4,75"S	37 56'1,09"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 1989	15	CER	Cana-de-açúcar	28/03/2012	IBT	17 30'38,9"S	51 14'17,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 2562 ^h	15	CER	Milho	04/09/2012	MS/P	17 30'18,4"S	51 14'36,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4776	15	MA	Veg. nativa	06/09/2013	MS/C	9 52'4,08"S	36 19'8,78"W	T. Vilela/AL ^f
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4767	15	MA	Veg. nativa	06/09/2013	MS/P	9 51'7,46"S	36 20'0,53"W	T. Vilela/AL ^f
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 1804 ^h	15	MA	Veg. nativa	14/08/2012	IBG	9 52'4,97"S	36 20'1,95"W	T. Vilela/AL ^f
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 2292	9	MA	Veg. nativa	14/03/2012	IBG	9 51'7,38"S	36 20'3,08"W	T. Vilela/AL ^f
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 4676 ^h	36	MA	Veg. nativa	14/03/2012	IBT	9 51'7,30"S	36 20'0,40"W	T. Vilela/AL ^f

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código ^a	H ^b	Bioma ^c	Vegetação	Data	Método ^d	Latitude	Longitude	Local ^g
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 3364 ^h	4	AMA	Banana	09/03/2013	IBT	11 54'3,21"S	55 29'2,34"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 3124	4	AMA	Banana	09/03/2013	IBT	11 54'6,05"S	55 29'8,05"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 2540	4	AMA	Banana	31/07/2012	IBT	11 54'3,27"S	55 29'2,23"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4457	7	AMA	Banana	13/09/2013	IBG	11 54'3,35"S	55 29'2,43"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4445	7	AMA	Banana	13/09/2013	IBG	11 54'6,12"S	55 29'8,14"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4288 ^h	4	AMA	Banana	13/09/2013	MS/P	11 54'6,15"S	55 29'8,07"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4185	4	AMA	Banana	09/03/2013	IBG	11 54'3,35"S	55 29'2,43"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4284	7	AMA	Banana	13/09/2013	MS/P	11 56'1,28"S	55 29'4,16"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4108	4	AMA	Banana	13/09/2013	IBT	11 54'6,15"S	55 29'8,07"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4290 ^h	7	AMA	Banana	13/09/2013	MS/P	11 54'3,35"S	55 29'2,43"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4314	4	AMA	Banana	09/03/2013	MS/C	11 54'3,23"S	55 29'2,44"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 2541 ^h	4	AMA	Banana	31/07/2012	MS/C	11 54'3,23"S	55 29'2,44"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 2543	4	AMA	Banana	31/07/2012	MS/P	11 54'3,34"S	55 29'2,10"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 2371	4	AMA	Banana	31/07/2012	IBG	11 54'3,21"S	55 29'2,34"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4152	7	AMA	Milho	23/03/2013	IBG	11 51'1,27"S	55 22'6,73"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4395 ^h	7	AMA	Milho	23/03/2013	IBT	11 51'1,27"S	55 22'6,73"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 2407 ^h	7	AMA	Milho	14/08/2012	IBG	11 52'6,98"S	55 22'6,48"W	Sinop/MT
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 3236	7	CAA	Veg. nativa	10/09/2013	IBG	9 25'5,20"S	37 57'4,30"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 3237	7	CAA	Veg. nativa	10/09/2013	IBG	9 24'06,1"S	37 58'1,24"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 3235	7	CAA	Feijão	10/09/2013	IBG	9 25'2,88"S	37 57'3,03"W	D. Gouveia/AL ^e
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 3350	7	MAT	Veg. nativa	06/09/2013	IBG	9 52'5,01"S	36 20'1,87"W	T. Vilela/AL ^f
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 3352	7	MAT	Veg. nativa	06/09/2013	IBG	9 52'4,08"S	36 19'8,78"W	T. Vilela/AL ^f
<i>M. pingshaense</i>	ESALQ 4775	7	MAT	Veg. nativa	06/09/2013	MS/P	9 52'5,06"S	36 20'1,92"W	T. Vilela/AL ^f
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4925 ^h	25	AMA	Veg. nativa	12/03/2012	IBT	11 53'4,41"S	55 23'6,43"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4876	27	AMA	Veg. nativa	07/08/2012	MS/C	11 54'6,07"S	55 29'7,93"W	Sinop/MT

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(continuação)

Espécie	Código^a	H^b	Bioma^c	Vegetação	Data	Método^d	Latitude	Longitude	Local^g
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4069 ^h	27	AMA	Veg. nativa	21/09/2013	IBG	11 52'3,90"S	55 23'8,69"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4073 ^h	33	AMA	Veg. nativa	21/09/2013	IBG	11 53'4,41"S	55 23'6,43"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4287 ^h	31	AMA	Banana	13/09/2013	MS/P	11 56'2,68"S	55 29'0,56"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 2370	31	AMA	Banana	31/07/2012	IBG	11 54'6,05"S	55 29'8,05"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 3715 ^h	13	AMA	Milho	05/09/2013	IBG	11 50'9,13"S	55 22'1,15"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4637 ^h	30	AMA	Milho	05/09/2013	MS/P	11 51'7,18"S	55 22'6,34"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4614 ^h	35	AMA	Milho	23/03/2013	MS/P	11 52'6,87"S	55 22'6,42"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4376 ^h	35	AMA	Milho	23/03/2013	IBT	11 51'7,27"S	55 22'6,36"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 3651	8	CER	Veg. nativa	04/06/2013	IBG	17 30'05,2"S	51 13'42,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 2989 ^h	1	CER	Veg. nativa	05/09/2012	IBT	17 30'05,4"S	51 13'35,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 3664 ^h	12	CER	Veg. nativa	04/06/2013	IBG	17 29'51,4"S	51 13'31,2"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 3616	11	CER	Veg. nativa	04/06/2013	IBT	17 30'05,6"S	51 13'41,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 2553	11	CER	Veg. nativa	05/09/2012	MS/P	17 30'05,9"S	51 13'42,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4544 ^h	29	CER	Veg. nativa	04/06/2013	MS/P	17 30'05,6"S	51 13'41,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4532 ^h	8	CER	Veg. nativa	04/06/2013	MS/P	17 29'49,5"S	51 13'40,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4548 ^h	32	CER	Veg. nativa	04/06/2013	MS/P	17 30'08,6"S	51 13'35,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 1781 ^h	1	CER	Veg. nativa	27/03/2012	MS/P	17 29'49,3"S	51 13'40,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 2030	29	CER	Veg. nativa	27/03/2012	MS/P	17 29'50,4"S	51 13'31,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 2383	33	CER	Veg. nativa	05/09/2012	IBG	17 29'51,2"S	51 13'31,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 2048	1	CER	Veg. nativa	27/03/2012	IBT	17 29'50,4"S	51 13'31,3"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 2474	11	CER	Veg. nativa	05/09/2012	IBT	17 30'05,9"S	51 13'42,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 1833	1	CER	Veg. nativa	27/03/2012	IBG	17 29'49,3"S	51 13'40,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 2101	32	CER	Veg. nativa	27/03/2012	IBG	17 29'59,3"S	51 13'42,6"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 2071	1	CER	Veg. nativa	27/03/2012	IBT	17 29'49,3"S	51 13'40,7"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4764 ^h	21	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	IBG	17 25'39,5"S	51 38'44,4"W	Rio Verde/GO

Anexo A – Descrição dos isolados de *Metarhizium* sp. sequenciados com a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3, incluindo código de acesso à Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, número do haplótipo, bioma, tipo de vegetação, data da amostragem, método de isolamento, coordenadas geográficas, cidade e estado de coleta

(conclusão)

Espécie	Código ^a	H ^b	Bioma ^c	Vegetação	Data	Método ^d	Latitude	Longitude	Local ^g
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4164	21	CER	Cana-de-açúcar	29/01/2013	IBT	17 25'39,5"S	51 38'44,4"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 3735 ^h	1	CER	Soja	30/01/2013	IBG	17 30'37,3"S	51 13'39,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 3742 ^h	11	CER	Soja	30/01/2013	IBG	17 30'35,3"S	51 14'19,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 3996 ^h	1	CER	Soja	30/01/2013	IBT	17 30'26,2"S	51 14'11,8"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4002	1	CER	Soja	30/01/2013	IBT	17 30'37,3"S	51 13'39,5"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4829 ^h	28	CER	Soja	30/01/2013	MS/P	17 30'35,3"S	51 14'19,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4823 ^h	11	CER	Soja	30/01/2013	MS/P	17 30'37,1"S	51 13'41,8"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 4207 ^h	29	CER	Soja	30/01/2013	IBT	17 30'18,8"S	51 14'33,9"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 1	ESALQ 3731	11	CER	Soja	30/01/2013	IBG	17 30'25,5"S	51 14'13,1"W	Rio Verde/GO
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	ESALQ 4684 ^h	10	AMA	Veg. nativa	21/09/2013	MS/P	11 53'4,42"S	55 23'6,37"W	Sinop/MT
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	ESALQ 3947 ^h	10	CAA	Veg. nativa	10/09/2013	IBT	9 25'0,36"S	37 57'8,36"W	D. Gouveia/AL
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	ESALQ 3240	10	CAA	Veg. nativa	10/09/2013	IBG	9 27'0,58"S	37 55'5,50"W	D. Gouveia/AL
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	ESALQ 3988	10	CAA	Veg. nativa	09/04/2013	IBT	9 25'0,04"S	37 57'4,90"W	D. Gouveia/AL
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	ESALQ 3239	10	CAA	Veg. nativa	10/09/2013	IBG	9 25'0,36"S	37 57'8,36"W	D. Gouveia/AL
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	ESALQ 3991	10	CAA	Veg. nativa	09/04/2013	IBT	9 27'1,25"S	37 55'9,26"W	D. Gouveia/AL
<i>Metarhizium</i> sp. indet. 3	ESALQ 3746	10	CAA	Veg. nativa	09/04/2013	IBG	9 25'0,24"S	37 57'8,24"W	D. Gouveia/AL
espécie não identificada	ESALQ 4615 ^h	26	AMA	Milho	23/03/2013	MS/P	11 50'8,99"S	55 22'1,12"W	Sinop/MT
espécie não identificada	ESALQ 2812 ^h	17	AMA	Veg. nativa	07/08/2012	MS/P	11 53'4,42"S	55 23'6,37"W	Sinop/MT

^aTodos os isolados deste estudo foram recuperados a partir de amostras de solo

^bReferência ao número do haplótipo para a região espaçadora intergênica do DNA nuclear MzIGS3

^cBiomas brasileiros: AMA-Amazônia, CAA-Caatinga, CER-Cerrado, MAT-Mata Atlântica e PAM-Pampa

^dMétodo de isolamento: IBG-“Insect bait” utilizando *Galleria mellonella*, IBT-“Insect bait” utilizando *Tenebrio molitor*, MS/P-Meio seletivo utilizando o meio de cultura “PDAY” e MS/C-Meio seletivo utilizando o meio de cultura “CTC-1T”

^eCidade de Delmiro Gouveia-AL;

^fCidade de Teotônio Vilela-AL

^gEstados brasileiros: MT-Mato Grosso, AL-Alagoas, GO-Goiás e RS-Rio Grande do Sul

^hIsolados sequenciados com a região nuclear 5'-TEF