Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Uso de *Metarhizium* spp. na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças

Ana Carolina Oliveira Siqueira

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

Piracicaba
2016

Ana Carolina Oliveira Siqueira
Licenciada em Ciências Biológicas

Uso de *Metarhizium* spp. na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2016

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

Siqueira, Ana Carolina Oliveira
Uso de *Metarhizium* spp. na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças / Ana Carolina Oliveira Siqueira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
94 p. : il.

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

1. Cana-de-açúcar 2. *Metarhizium* 3. Promoção de crescimento 4. Antagonismo I. Título

CDD 633.61
S618u

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

DEDICATÓRIA

À **Deus**, pela coragem que me dá em cada nova etapa de minha vida, pela força de não desistir diante das dificuldades e pela sabedoria que me proporciona todos os dias para que eu possa concretizar meus planos.

Aos meus pais **Rita** e **José**, pelo amor, apoio e incentivo que sempre me deram e por me ensinarem a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu amor **Aristides** pelo companheirismo e compreensão, pelo seu amor e por sempre estar ao meu lado me motivando a persistir.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e a Universidade de São Paulo (USP) pelo acolhimento que recebi ao ingressar nesta instituição.

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelos ensinamentos e conselhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Italo Delalibera Junior, por me receber em seu laboratório no ano de 2010, me proporcionando a oportunidade de desenvolver minhas habilidades no campo científico dentro da patologia de insetos. Pelos ensinamentos, paciência e incentivos durante o mestrado, pela atenção no período final de elaboração desta dissertação e principalmente por confiar este projeto a mim.

Aos amigos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ-USP, pelos bons momentos de convivência e aprendizado em especial à Janayne M. Rezende, Celeste P. D’Alessandro, Ana Beatriz R. Zanardo e Vanessa S. Duarte pela amizade.

À bióloga e técnica de laboratório Solange Ap. Vieira de Barros pelo auxílio nas etapas e nos desafios de minha pesquisa.

À todos os estagiários e alunos que contribuíram para o desenvolvimento dos experimentos de minha pesquisa, pelo esforço, ajuda e amizade.

Aos amigos que fiz durante as disciplinas do Mestrado, pelo apoio nos trabalhos e aulas práticas, principalmente à Ana Clara, Natasha e Larissa pela amizade e momentos de descontração fora da universidade.

Aos alunos Reginaldo F. Hilário, Djair Durand, Altemir Braga e à Prof. Dra. Clarisse Gracia Borges Demétrio pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

"Para cada tempestade, um arco-íris,
Para cada lágrima, um sorriso,
Para cada cuidado, uma promessa,
Para cada problema, a vida lhe traga
alguém fiel com quem dividi-lo,
Para cada olhar, uma doce canção,
E para cada oração,
uma grande resposta".

Pe. Fábio de Melo

SUMÁRIO

RESUMO 13
ABSTRACT 15
1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Cana-de-açúcar no Brasil: Importância e associação com pragas e doenças 19
2.2 Ocorrência de espécies de *Metarhizium* no Brasil 20
2.3 Interações de *Metarhizium* spp. com solo, inseto e rizosfera 22
2.4 *Metarhizium* spp. e plantas: capacidade endofítica, promoção de crescimento e antagonismo 23
2.5 Mecanismos de controle à fitopatógenos e promoção de crescimento mediados por microrganismos 24
3 MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1 Isolados de *Metarhizium* spp. 27
3.2 Ensaio de promoção de crescimento em casa-de-vegetação 27
3.2.1 Inoculação de *Metarhizium* spp. pelo método de aplicação de suspensão direta no solo 28
3.2.2 Inoculação de *Metarhizium* spp. pelo método de imersão de gemas em suspensão 29
3.2.3 Avaliação da promoção de crescimento de cana-de-açúcar 29
3.2.4 Avaliação da recuperação de *Metarhizium* spp. de tecidos da planta de cana-de-açúcar e avaliação do teor de clorofila 30
3.2.4.1 Colonização e persistência de *Metarhizium* spp. em tecidos de plantas de cana-de-açúcar 30
3.2.4.2 Teor de clorofila em mudas de cana-de-açúcar inoculadas com *Metarhizium* spp. 31
3.3 Ensaio de promoção de crescimento em campo 32
3.3.1 Plantio de gemas de cana-de-açúcar inoculadas com *Metarhizium* spp. 32
3.3.2 Transplantio das mudas germinadas para tubetes 34
3.3.3 Plantio das mudas de cana-de-açúcar dos tubetes para o campo 34
3.4 Bioensaios de patogenicidade e repelência de plantas inoculadas com *Metarhizium* spp. a broca da cana e nematóide 35
3.4.1 Bioensaio com *Diatraea saccharalis* 36
3.5 Experimentos de antagonismo de *Metarhizium* spp. aos fitopatógenos *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum* 37
3.5.1 Antagonismo em cultivo pareado “in vitro” 37
3.5.2 Avaliação do antagonismo por voláteis 38
3.5.3 Avaliação do antagonismo em meio liquido 39
3.5.4 Experimento de cultivo pareado “in vitro” entre *Metarhizium* spp. e *Trichoderma harzianum* 39

3.6 Ensaios de métodos qualitativos para determinação de características fisiológicas associadas à função de promoção de crescimento e antagonismo de *Metarhizium* spp. . 40

3.6.1 Verificação da capacidade de produção de ß-1,3-Glucanase pelos isolados de *Metarhizium* spp. ... 40

3.6.2 Verificação da capacidade de produção de Sideróforos pelos isolados de *Metarhizium* spp. ... 41

3.7 Análises estatísticas ... 42

4 RESULTADOS ... 43

4.1 Ensaio de promoção de crescimento em casa-de-vegetação ... 43

4.1.1 Inoculação de *Metarhizium* spp. pelo método de aplicação de suspensão direta no solo e imersão de gemas em suspensão ... 43

4.1.2 Recuperação de *Metarhizium* spp. de tecidos da planta de cana-de-açúcar e avaliação do índice de clorofila ... 48

4.1.2.1 Colonização e persistência de *Metarhizium* spp. em tecidos de mudas de cana-de-açúcar ... 48

4.1.2.2 Teor de clorofila das mudas de cana-de-açúcar inoculadas com *Metarhizium* spp. ... 51

4.2 Ensaio de promoção de crescimento em campo ... 53

4.2.1 Plantio de pré-germinação de cana-de-açúcar inoculada com *Metarhizium* spp. ... 53

4.2.2 Transplantio das mudas germinadas para tubetes ... 55

4.2.3 Tamanho de parte aérea e colonização das raízes de cana-de-açúcar tratadas com *Metarhizium* spp. ... 58

4.2.4 Plantio das mudas de cana-de-açúcar dos tubetes no campo ... 62

4.3 Bioensaios de patogenicidade e repelência de plantas inoculadas com *Metarhizium* spp. a insetos praga e nematóide da cultura da cana-de-açúcar ... 64

4.3.1 Bioensaio com *D. saccharalis* ... 64

4.3.2 Bioensaio com *M. javanica* ... 65

4.4 Experimentos de antagonismo de *Metarhizium* spp. aos fitopatógenos *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum* ... 66

4.4.1 Avaliação do antagonismo “in vitro”: cultivo pareado ... 66

4.4.2 Avaliação do antagonismo por voláteis ... 70

4.4.3 Avaliação do antagonismo em meio liquido ... 72

4.4.4 Experimento de cultivo pareado “in vitro” entre *Metarhizium* spp. e *T. harzianum* ... 73

4.5 Ensaios de métodos qualitativos para determinação de características fisiológicas associadas a função de promoção de crescimento e antagonismo de *Metarhizium* spp. . 75

4.5.1 Verificação da capacidade de produção de ß-1,3-Glucanase pelos isolados de *Metarhizium* spp. ... 75

4.5.2. Verificação da capacidade de produção de Sideróforos pelos isolados de *Metarhizium* spp. ... 77

5 DISCUSSÃO ... 79

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 85
REFERÊNCIAS 87

RESUMO

Uso de *Metarhizium* spp. na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças

Os fungos do gênero *Metarhizium* são entomopatogênicos e ainda apresentam relações endofíticas e podem viver saprofiticamente no solo. A associação desses microrganismos com insetos é bem conhecida, mas as interações diretas com as plantas ainda são incipientes. Objetivou-se com este estudo, determinar a capacidade de colonização endofítica em raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) de *M. robertsii*, *M. anisopliae* e três linhagens brasileiras recém-descobertas, bem como revelar o potencial destes fungos como antagonistas a dois fungos fitopatogênicos responsáveis pela podridão-vermelha (*Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*) e no controle de duas importantes pragas, a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* e o nematóide-das-galhas, *Meloidogyne javanica*. Foram utilizados 24 isolados de *Metarhizium* spp. nos experimentos de promoção de crescimento de plantas após a inoculação em gemas de cana-de-açúcar em condições de casa-de-vegetação e campo. O efeito da inoculação do fungo em mudas de cana-de-açúcar foi investigado quanto a mortalidade e redução no desenvolvimento de *D. saccharalis* e redução nas populações de *M. javanica*. Experimentos de inibição *in vitro* em cultivo pareado foram conduzidos com os fungos *F. moniliforme* e *C. falcatum* e *Trichoderma harzianum*. Além disto, foram realizados testes qualitativos "in vitro" para avaliar a capacidade desses fungos em produzir ß-1,3-Glucanase e Sideróforos. A inoculação de *Metarhizium* de todas as espécies testadas promoveu o crescimento de parte aérea, peso úmido e seco de raízes em relação ao controle (água). Enquanto o tratamento de gemas rotineiramente usado na usina onde se realizou a produção de mudas pré-brotadas com aplicação do fungicida Comet® + o fertilizante Biozyme TF resultou em pegamento de 32% e 59,6%, apenas com o uso de isolados de *Metarhizium* spp. estes valores foram de até 50% e 86,4%, nos dois experimentos em campo, respectivamente. As mortalidades observadas em lagartas de *D. saccharalis* que se alimentaram das plantas inoculadas com isolados de *Metarhizium* spp. atingiram valores de até 80%, sendo a mortalidade confirmada pela esporulação do fungo de até 55%. As lagartas sobreviventes apresentaram menor peso do que aquelas do controle não tratado. A inoculação de *Metarhizium* spp. em mudas de cana-de-açúcar conferiu proteção a *M. javanica*, resultando em uma densidade de massa de ovos por grama de raiz nas mudas inoculadas com o fungo até 59,8% menor no primeiro experimento e 64,1% menor no segundo em relação as mudas sem inoculação. Os ensaios de antagonismo mostraram que, todos os isolados de *Metarhizium* spp. apresentaram alguma forma de inibição tanto para *F. moniliforme* como para *C. falcatum*. Dos 24 isolados testados, 20,8% produziram a enzima hidrolítica, ß-1,3-glucanase, o que pode estar associado a capacidade de inibição dos fungos fitopatogênicos. Constatou-se que 8 (33,3%) dos isolados produziram sideróforos e sugere que esses fungos apresentam mecanismos de disponibilização do ferro. O conhecimento gerado com este estudo poderá subsidiar novas estratégias de utilização de *Metarhizium* spp. em campo na produção de MPB de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; *Metarhizium* ; Promoção de crescimento, Antagonismo;

ABSTRACT

Use of *Metarhizium* spp. in the production of pre-sprouted seedlings of sugarcane and its effects on plant, pests and diseases

The fungi of the genus *Metarhizium* are entomopathogenic and still have endophytic relations and can live in the soil as saprophytes. The association of these microorganisms with insects is well known, but the direct interactions with the plants are still incipient. The objective of this study was to determine the endophytic colonization capacity in sugarcane roots (*Saccharum* spp.) of *M. robertsii*, *M. anisopliae* and three new Brazilian lineages and to reveal the potential of these fungi as antagonists to two pathogenic fungi responsible for red rot (*Fusarium moniliforme* and *Colletotrichum falcatum*) and in control of two major pests, the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* and nematode, *Meloidogyne javanica*. Twenty four isolates of *Metarhizium* spp. were used in plant growth promoting experiments after inoculation in sugarcane plantings in greenhouse and field. The effect of fungal inoculation of sugarcane seedlings was investigated on mortality and development of *D. saccharalis*, and populations reduction of *M. javanica*. Inhibition experiments were conducted by in vitro co-cultivation with the fungi *F. moniliforme* and *C. falcatum* and *Trichoderma harzianum*. Moreover, qualitative tests were carried out "in vitro" for evaluating the capacity of fungi to produce beta-1,3-glucanase and Siderophores. The inoculation of *Metarhizium* of all species tested promoted the shoot growth, wet and dry root weight compared to control (water). While chemical treatment of seedlings routinely used in sugarcane mills with fungicide application COMET® and fertilizer (Biozyme TF) resulted in 32% and 59.6% efficacy, only with the use of *Metarhizium* spp. these values were 50% and 86.4%, in both experiments in the field, respectively. Mortalities observed in caterpillars of *D. saccharalis* that fed the plants inoculated with isolates of *Metarhizium* spp. reached values of 80%, with the rate of confirmed mortality up to 55%. Caterpillars survivors had lower weight than the untreated control. The inoculation of *Metarhizium* spp. in sugarcane seedlings conferred protection to *M. javanica*, resulting in density of egg mass per gram of root in seedlings inoculated with the fungus 59.8% lower in the first experiment and 64.1% lower in the second compared to the seedlings without inoculation. Antagonism assays showed that all isolates of *Metarhizium* spp. had somehow inhibiting both *F. moniliforme* and *C. falcatum*. Among the 24 isolates tested, 20.8% produced the hydrolytic enzyme beta-1,3-glucanase, which may be associated with the ability of inhibiting the phytopathogenic fungi. It was found that eight (33.3%) isolates produced siderophores and suggests that these fungi have iron delivery mechanisms. The knowledge generated by this study may help new strategies for use of *Metarhizium* spp.on field to produces sugarcane seedlings.

Keywords: Sugar cane; *Metarhizium*; Growth promotion; Antagonism;

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar apresenta grande importância econômica no Brasil devido à produção de açúcar, utilizado para consumo interno e exportação, e também pela produção de etanol, que é uma alternativa aos combustíveis derivados do petróleo (MARTINS, 2004). Estima-se que a produção brasileira da safra 2015/2016 tenha um incremento de 4,5% em relação à safra anterior, sendo o estado de São Paulo detentor da metade da área de cana plantada (4.648,2 mil ha) seguido por Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas, Pernambuco e Mato Grosso (CONAB, 2015).

A adoção do corte mecanizado na colheita da cana em substituição à queimada aliado à expansão contínua da área plantada, tem favorecido um aumento nas populações de espécies que causam sérios prejuízos econômicos. Dentre elas encontram-se *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae), o nematóide *Meloidogyne javanica*, entre outras. Os danos que essas pragas causam podem ser considerados diretos por reduzirem a produção e a qualidade da matéria-prima e indiretos, como no caso de *D. saccharalis*, cuja abertura de galerias ocasionada pelas lagartas favorece a penetração de microrganismos fitopatogênicos, especialmente dos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*.

Metarhizium spp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) destaca-se como um importante agente utilizado para o controle de diversas espécies e são abundantes nos solos de habitats variados (ZIMERMANN, 2007; BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012). Recentemente foi descoberta a associação endofítica deste fungo com muitas espécies de plantas (BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012) tendo proporcionado benefícios no seu crescimento (SASAN; BIDOCHKA, 2012), na aquisição de nutrientes (BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012 BEHIE; BIDOCHKA, 2014; FANG; ST. LEGER, 2010), proteção contra fitopatógenos (KEYSER; JENSEN; MEYLING, 2015; SASAN; BIDOCHKA, 2013), herbivoria (BATTA, 2013; KEYSER; THORUP-KRISTENSEN; MEYLING, 2014; PARSA; ORTIZ;VEGA, 2013) e stress abiótico (KHAN, 2012).

Sete espécies que pertencem ao complexo *M. anisopliae* foram identificadas no Brasil, utilizando a região 5'-TEF (*Translation Elongation Factor*), sendo elas *M. pingshaense*, *M. anisopliae* s.s., *M. robertsii* e *M. brunneum*, *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; ZANARDO, 2015). *M. pemphigi* (=*M. flavoviride* var. *pemphigi*), *M. rileyi* e *M. brasiliense* também ocorrem no Brasil (KEPLER et al., 2014; ROCHA et al., 2013). Quatro outras novas linhagens foram identificadas no Brasil isoladas de amostras de solo e rizosfera 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; ZANARDO, 2015), *Metarhizium* sp. indet. 2 (REZENDE et al., 2015) e *Metarhizium* sp. indet. 3 (ZANARDO, 2015) provavelmente relacionadas ao clado MGT e por fim, *Metarhizium* sp. indet. 4 (REZENDE, 2014), uma espécie mais basal.

Estudos sobre a colonização e persistência de *Metarhizium* spp., especialmente dessas novas linhagens, em culturas de grande importância como a cana-de-açúcar ainda não foram realizados. Também não é conhecido o potencial destes fungos no antagonismo a fungos causadores de doenças e os efeitos em pragas. A aplicação de *Metarhizium* via solo é mais uma estratégia promissora para contribuir para uma agricultura mais sustentável.

Desta forma, objetivou-se com este estudo determinar a capacidade de colonização endofítica de diferentes espécies de *Metarhizium* spp. em raízes de cana-de-açúcar (*S. oficinarum*) bem como seu potencial como antagonista a dois fungos fitopatogênicos (*Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*) e para o controle de duas importantes pragas como a broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis* e o nematóide *Meloidogyne javanica*.

Outros objetivos como a elucidação dos mecanismos deste fungo para o controle de fitopatógenos, como por exemplo, por meio da produção de enzimas hidrolíticas e das estratégias de que o mesmo usa conferindo efeitos probióticos também foram estudados de modo a melhor compreender estes mecanismos ainda não estudados para isolados brasileiros. O conhecimento gerado com este estudo poderá subsidiar novas estratégias de aplicação de *Metarhizium* spp., na cultura da cana, trazendo benefícios para a planta tanto em relação ao seu crescimento e desenvolvimento, como para a repelência de aos insetos associados a ela.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar no Brasil: Importância e associação com pragas e doenças

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum* spp. É uma planta tipo C4, monocotiledônea de ciclo perene e própria de climas tropicais e subtropicais (FERRARI, 2010). O tempo de desenvolvimento após o plantio pode ser de 12 (cana de ano) e 18 meses (cana de ano e meio), sendo denominada de "cana-planta" para a cana de primeiro corte. Após o primeiro corte, passa a ser denominada "cana-soca", com cortes anuais por cinco anos em média (ALFONSI et al., 1987).

No Brasil, a cana-de-açúcar apresenta grande importância econômica, pois, além de o país ser o maior produtor também é o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. Responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o País deve alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25%, até 2018/19, e colher 47,34 milhões de toneladas do produto, o que corresponde a um acréscimo de 14,6 milhões de toneladas em relação ao período 2007/2008. Para as exportações, o volume previsto para 2019 é de 32,6 milhões de toneladas (MAPA, 2015). O estado de São Paulo é detentor da metade da área de cana plantada (4.648,2 mil ha) no país seguido por Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas, Pernambuco e Mato Grosso (CONAB, 2015).

A política nacional para a produção da cana-de-açúcar se orienta na expansão sustentável da cultura, com base em critérios econômicos, ambientais e sociais (MAPA, 2015). Neste sentindo, o Decreto-Lei Estadual n° 42.056/9, que dispõe sobre a proibição da queimada na colheita e da adoção do corte mecanizado, vem trazendo benefícios como a melhoria da qualidade agroindustrial da cana como, menor custo de cultivo, melhoria da absorção de água, além das questões ambientais pela conservação do solo que contribuem para aumento sustentável da produtividade e questões de saúde das populações próximas à áreas de canaviais (LEAL et al., 2008). Por outro lado, pragas antes consideradas de importância secundária tiveram um aumento significativo nas suas populações após estas mudanças (DINARDO-MIRANDA; FERREIRA, 2004).

O agroecossistema formado pela cultura da cana-de-açúcar abriga numerosas espécies que podem ocasionar sérios prejuízos econômicos. Dentre as principais pragas desta cultura podemos citar: complexo de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) incluindo *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) e *M. posticata* (Stal, 1855), *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)

(Lepidoptera: Crambidae), *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae), *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Cerambycidae), complexo de cupins (Ordem Isoptera) dos gêneros *Syntermes* spp., *Nasutitermes* sp., *Neocapritermes* sp. e *Heterotermes* sp., formigas cortadeiras como por exemplo *Atta laevigata* (Fr. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae) e nematóides (*Meloidogyne javanica e M. incognita*).

Diatraea saccharalis é uma das mais importantes pragas da cana-de-açúcar no Brasil e está distribuída em todas as regiões canavieiras do país (DINARDO-MIRANDA, 2008). Seu ciclo biológico dura em torno de dois meses, existindo potencial de quatro a cinco gerações anuais, dependendo das condições climáticas (GALLO et al., 2002). Logo após a eclosão, as lagartas se alimentam do parênquima foliar, no interior da bainha da folha, e após a primeira ecdise, penetram na parte mais mole do colmo, perfurando-o e abrindo galerias de baixo para cima. Nessas galerias permanecem durante a fase de pupa e quando os adultos emergem buscam novos lugares para oviposição.

O dano provocado pelas lagartas pode ser considerado direto, pela abertura de galerias, que levam a morte dos perfilhos e em plantas jovens, secamento dos ponteiros, que é popularmente conhecido como “coração morto” e danos indiretos quando os orifícios favorecem a penetração de microrganismos fitopatogênicos no interior do colmo, especialmente dos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme* que causam a “podridão vermelha do colmo”, reduzindo o teor de açúcar nos colmos devido à inversão da sacarose armazenada na planta e contaminam o caldo que dificulta o processo de fermentação (BOTELHO; MACEDO, 2002; DINARDO-MIRANDA, 2008).

O nematóide *M. javanica* está associado ao sistema radicular das plantas de cana-de-açúcar. No local onde penetra e começa a se alimentar, ocorre a formação de células gigantes, ou seja, aumento de tamanho (hipertrofia) e multiplicação de células (hiperplasia) que são as conhecidas galhas de variados tamanhos. O sistema radicular torna-se, então, ineficiente na absorção de água e nutrientes, afetando o desenvolvimento e a produção da cultura. Plantas atacadas por nematóides se tornam, geralmente, mais predispostas ao ataque de outras pragas e doenças (ABAWI; CHEN, 1998). No Brasil, os prejuízos por esta praga são da ordem de 20 a 30 % de redução da produção (DINARDO-MIRANDA, 2005).

2.2 Ocorrência de espécies de *Metarhizium* no Brasil

De grande importância no Brasil e no mundo, o gênero *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) destaca-se como um importante agente para o controle de pragas, ocorrendo

naturalmente em mais de 300 espécies de insetos, pode ser encontrado em solos de habitats variados do mundo inteiro (ZIMMERMANN, 2007) e recentemente foi descoberta sua associação endofítica com muitas espécies de plantas (BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012).

O complexo *M. anisopliae* é composto por nove espécies que foram identificadas e caracterizadas com base em técnicas moleculares e uso combinado de genes que oferecem um suporte robusto e confiável. Bischoff, Rehner e Humber (2009) descreveram duas novas espécies (*M. globosum* e *M. robertsii*), três variedades foram elevadas ao 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, dois clados foram reconhecidos, PARB formado pelas espécies *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii* e *M. brunneum* e MGT referido assim por representar *M. majus* e *M. guizhouense* (= M. taii).

Sete espécies deste complexo já foram identificadas no Brasil, utilizando a região 5'-TEF (*Translation Elongation Factor*), sendo elas *M. pingshaense*, *M. anisopliae* s.s., *M. robertsii* e *M. brunneum* pertencentes ao clado PARB 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; ZANARDO, 2015). *M. pemphigi* (=*M. flavoviride* var. *pemphigi*), *M. rileyi* e *M. brasiliense* também ocorrem no Brasil (KEPLER et al., 2014; ROCHA et al., 2013). Quatro outras novas linhagens foram reconhecidas em solo e rizosfera brasileira 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; ZANARDO, 2015), *Metarhizium* sp. indet. 2 (REZENDE et al., 2015) e *Metarhizium* sp. indet. 3 (ZANARDO, 2015) provavelmente designadas no clado MGT e por fim, *Metarhizium* sp. indet. 4 (REZENDE, 2014).

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin, 1883 é a espécie com maior número de registros de produtos no MAPA e disparadamente é o fungo entomopatogênico mais comercializado pelas empresas brasileiras e produzido em grande escala por usinas de cana-de-açúcar, utilizando arroz parboilizado (ALVES, 1998), para 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 tenha ultrapassado 2 milhões de hectares na cultura da cana-de-açúcar em 2011

(BETTIOL, 2011). Este fungo também tem sido estudado para o controle de insetos vetores de doenças em humanos por alguns grupos de pesquisa (MNYONE et al., 2009).

Apesar da ampla utilização de *M. anisopliae* para o controle de cigarrinhas, pouco se conhece sobre os mecanismos de colonização endofítica desta e de outras espécies do gênero bem como seus efeitos na persistência e promoção de crescimento em plantas de grande importância como a cana-de-açúcar.

2.3 Interações de *Metarhizium* spp. com solo, inseto e rizosfera

Propágulos do fungo *Metarhizium* sp. são encontrados em todo o mundo, desde o ártico até as regiões tropicais, atingindo até 10^6 conídios por grama de solo (BEHIE; BIDOCHKA, 2014). Bidochka et al. (1998) sugerem que, este fungo é mais abundante em solo agrícolas, entretanto, diversos grupos de pesquisa brasileiros recuperaram grandes quantidades de isolados deste entomopatógeno em áreas com vegetação nativa (ROCHA et al., 2013; ZANARDO, 2015).

Bidochka et al. (2001) revelaram em um estudo sobre estrutura genética de *M. anisopliae* que, a genética populacional deste fungo está mais relacionada com o tipo de habitat do que com a patogenicidade e o hospedeiro. Pesquisas recentes também têm demonstrado que *M. anisopliae* está mais comumente associado com o ambiente do solo (“below-ground”) do que com a parte aérea (“above-ground”) das plantas, infectando insetos hospedeiros (MEYLING et al., 2011).

Hu e St. Leger, (2002) relataram que *M. robertsii* tem dois estilos de vida distintos sendo um como patógeno de insetos e outro como habitante de solo mantendo relações saprofíticas e vivendo na rizosfera das plantas de forma endofíticas. Estes autores mostraram ainda que, o fungo está amplamente distribuído no solo, mas exibe preferencialmente associações com a rizosfera de plantas. Bruck (2005) também verificou que as populações de *Metarhizium* spp. são maiores na região da rizosfera. Em 2012, Behie e colaboradores verificaram que *Metarhizium* sp. é capaz de translocar o nitrogênio proveniente do inseto morto para a planta por meio de seu micélio que está associado a raiz conferindo assim, uma associação tritrófica (BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012). Behie et al. (2014) e Behie e Bidochka (2014) testaram a capacidade de cinco espécies de *Metarhizium* sp. de transferir nitrogênio derivado de insetos mortos para plantas. Os resultados indicaram que todas as espécies estudadas foram capazes de transferir quantidades significativas de nitrogênio derivado de insetos para as plantas. Além disso, a associação do fungo com as plantas proporcionou um aumento na sua produtividade.

A adesão de *M. robertsii* ao inseto e a plantas está relacionada à expressão de duas proteínas, MAD1 (*Metarhizium Adhesin-protein* 1) e MAD 2 (*Metarhizium Adhesin-protein* 2), que foram identificadas por indução de expressão na hemolinfa de insetos e no exsudato de plantas, respectivamente (WANG; ST. LEGER, 2007). Pava-Ripoll et al. (2011) quando estudaram a expressão diferencial de genes de *M. anisopliae* na presença de exsudatos de raízes de plantas de feijão em relação a isolados de fungos especialistas como *M. acridum* observaram que, MAD 2 presente em *M. anisopliae* é responsável por mediar a adesão do fungo na superfície de plantas, demonstrando que este possui genes relacionados à competência com a rizosfera induzidos pelos exudatos da mesma.

Gao et al. (2011), sequenciaram o genoma de *M. robertsii* entomopatógeno com um amplo espectro de hospedeiros e *M. acridum*, especifico à gafanhotos. A estrutura do genoma das duas espécies foram altamente sintênicas e análises filogenômicas sugeriram que elas divergiram cerca de 33-43 milhões de anos atrás, sendo mais próximas filogeneticamente de fungos endofíticos como *Epichloe festucae* e de fitopatógenos como *Fusarium graminearum* do que de patógenos de animais como *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*. Esses autores sugerem que, *Metarhizium* estava adaptado às plantas quando passaram a infectar insetos.

Desta forma, os estudos realizados mostram com clareza que *Metarhizium* sp. é mais do que apenas um fungo entomopatogênico, mas também está envolvido em outras formas de propagação como por exemplo na interação com plantas.

2.4 *Metarhizium* spp. e plantas: capacidade endofítica, promoção de crescimento e antagonismo

Durante muitos anos *Metarhizium* spp. foi utilizado como entomopatógeno, porém estudos recentes tem se voltado para a exploração da ecologia deste fungo em solos e plantas. Sasan e Bidochka (2012) utilizaram microscopia (confocal) para elucidar a colonização endofítica de *M. robertsii* em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e um tipo de gramínea (*Panicum virgatum*) e como resultado demonstraram que, o fungo colonizou endofiticamente as raízes das plantas, além de ter promovido o crescimento das raízes, quando comparado às plantas não tratadas com o fungo.

Em soja (*Glycine max*), plantas que receberam o fungo *M. anisopliae* apresentaram brotos mais altos, maior peso de biomassa fresca e seca, maiores conteúdos de clorofila e taxa de transpiração fotossintética em suas folhas e além disso, esta associação também auxiliou na diminuição do stress salino sofrido pelas plantas (KHAN, 2012). *M. anisopliae* colonizou

internamente plantas de canola (*Brassica napus*) e causou mortalidade de larvas de *Plutella xylostella* (BATTA, 2013). De acordo com Liao et al. (2013), além de proteção contra as pragas, fungos do gênero *Metarhizium* são capazes de impulsionar o crescimento da planta provendo nutrientes, nitrogênio e resistência crescente para a mesma. A promoção de crescimento de plantas proporcionada por este fungo também foi relatada em culturas de tomate (*Solanum lycopersicum*) (ELENA et al., 2011) e milho (*Zea mays*) (LIAO et al., 2014).

Outro aspecto interessante e recentemente apontado em relação à ecologia de *Metarhizium* spp. foi sua capacidade antagônica à fitopatógenos. Um estudo realizado com *M. robertsii* e o fitopatógeno, *Fusarium solani*, causador da podridão da raiz do feijão demonstrou a formação de uma pequena zona de inibição quando ambos os fungos foram cultivados "in vitro" (SASAN; BIDOCHKA, 2013). Keyser et al. (2014) estudou o antagonismo de *M. brunneum*, *M. robertsii* e *M. flavoviridae* ao fitopatógeno *Fusarium culmorum* e observou a formação de diferentes tamanhos de zonas de inibição. Esses estudos reforçam o fato de que *Metarhizium* sp. também apresenta capacidade antagonista.

Estudos que visam compreender os mecanismos de colonização e persistência de *Metarhizium* spp. em plantas, capacidade de antagonismos com importantes fungos causadores de doenças assim como entender a relação fungo-planta-inseto ainda são incipientes no Brasil e se mostram promissores diante do crescente interesse na agricultura sustentável.

2.5 Mecanismos de controle à fitopatógenos e promoção de crescimento mediados por microrganismos

A capacidade de microrganismos em promover crescimento de plantas e controlar fungos fitopatogênicos podeestar associada a produção de diversos compostos responsáveis por essas características. Dentre os mecanismos de antagonismo relacionados ao controle biológico de fitopatógenos está a produção de enzimas líticas, como a ß-1,3-Glucanase que tem a habilidade de degradar a ß-1,3-Glucana, componente da parede celular dos fungos, assim como a quitina (KAVINO et al., 2010).

Sideróforos são peptídeos com altíssima afinidade por ferro, produzidos por microrganismos presentes na rizosfera. A produção destes metabólitos é induzida em condições de baixas concentrações de ferro para sequestrar este elemento do ambiente externo ou do hospedeiro. A secreção dos sideróforos auxilia no crescimento da planta pelo aumento na disponibilidade de ferro próximo à raiz ou inibição da colonização de raízes de outras

plantas. A produção de sideróforos também pode suprimir organismos deletérios pela diminuição da disponibilidade de ferro (NEILANDS; LEONG, 1986). Além de atuarem na competição com outros organismos, essas substâncias também estão relacionadas a promoção de crescimento em plantas (AHMAD et al., 2008).

A maioria dos trabalhos sobre a produção destes e outros compostos para promoção de crescimento e antagonismo são realizados com rizobactérias e leveduras, porém espécies do fungo *Trichoderma* também tem sido alvo de estudos em relação ao controle biológico de doenças e promoção de crescimento, sendo mundialmente conhecidos seus benefícios e utilização na agricultura (KHAN et al., 2011)

Estudos sobre a produção destes compostos por fungos entomopatogênicos são importantes do ponto de vista de tentar explicar os mecanismos associados à capacidade de promoção de crescimento e antagonismo a fitopatógenos.

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi determinar a colonização endofítica de raízes e o potencial de diferentes espécies de *Metarhizium* spp. como antagonista de pragas e fitopatógenos e promotor de crescimento de cana-de-açúcar (*S. oficinarum* L). Os objetivos específicos foram:

-Verificar a capacidade de colonização endofítica dos isolados de *Metarhizium* spp. em plantas de cana-de-açúcar.

-Selecionar isolados de *Metarhizium* spp. que tenham a melhor capacidade de colonizar, se estabelecer e persistir nas plantas de cana-de-açúcar que forem inoculadas com os mesmos.

-Avaliar a promoção de crescimento de plantas de cana inoculadas com *Metarhizium* spp.

-Determinar se a colonização endofítica de cana-de-açúcar por *Metarhizium* spp. resulta em repelência, alterações no desenvolvimento ou mortalidade à *Diatraea saccharalis*, e *Meloidogyne javanica*

-Avaliar a capacidade antagônica dos isolados de *Metarhizium* spp. aos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, causadores do complexo broca-podridão vermelha na cultura da cana-de-açúcar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de *Metarhizium* spp.

Vinte e quatro isolados do gênero *Metarhizium* da Coleção de Entomopatógenos "Prof. Sérgio Batista Alves" do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP (Tabela 1) foram utilizados nesta pesquisa. Foram escolhidos isolados de *M. robertsii* que é a espécie de *Metarhizium* mais comum nos solos brasileiros, isolados de *M. anisopliae* provenientes de insetos e de produtos comerciais, além de representantes de espécies ainda não descritas. O isolado ESALQ-1306 de *Trichoderma harzianum* foi utilizado para efeito de comparação, já que este é amplamente utilizado comercialmente em tratamento de sementes como probiótico para promoção de crescimento e no controle biológico de doenças causadas por fungos fitopatogênicos.

Tabela 1 – Descrição dos isolados do gênero *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo

Código do isolado	Espécie	Origem	Local de coleta
ESALQ43	*M. anisopliae*	Hemiptera: Cercopidae	Fleixeiras del Estado - AL
ESALQ425	*M. anisopliae*	Hemiptera: Cercopidae	Iporanga-SP
ESALQ1037	*M. anisopliae*	Formicidae: Solenopsis	Porto Alegre-RS
ESALQ1426	*M. robertsii*	Solo	Londrina_PR
ESALQ1604	*M. anisopliae*	Biotech G, Biotech ®, Biocontrol	desconhecido
ESALQ1608	*Metarhizium* sp. indet. 1	Solo	Rio Verde-GO
ESALQ1610	*M. anisopliae*	Solo	Sinop-MT
ESALQ1614	*M. anisopliae*	Solo	Sinop_MT
ESALQ1615	*M. anisopliae*	Solo	Sinop_MT
ESALQ1616	*M. anisopliae*	Solo	Sinop_MT
ESALQ1617	*M. anisopliae*	Solo	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ1618	*M. robertsii*	Solo	Bagé-RS
ESALQ1622	*M. robertsii*	Solo	Sinop-MT
ESALQ1629	*M. robertsii*	Solo	Sinop-MT
ESALQ1634	*M. robertsii*	Solo	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ1635	*M. robertsii*	Solo	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ1636	*Metarhizium* sp. indet. 2	Solo	Sinop-MT
ESALQ1637	*Metarhizium*. sp. indet. 1	Solo	Rio Verde-GO
ESALQ1638	*Metarhzium* sp. indet. 1	Solo	Rio Verde-GO
ESALQ1641	*M. anisopliae*	Hemiptera: Cercopidae	Boca da Mata-AL
ESALQ1660	*Metarhizium* sp. indet. 4	Solo	Iracemápolis-SP
ESALQ1669	*M. anisopliae*	Solo	Iracemápolis-SP
ESALQ1684	*Metarhizium* sp. indet. 4	Rizosfera	Iracemápolis-SP
ESALQ1739	*Metarhizium* sp. indet. 1	Rizosfera	Iracemápolis-SP

3.2 Ensaio de promoção de crescimento em casa-de-vegetação

Isolados de *Metarhizium* spp. (Tabela 1) foram repicados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 ml de meio de cultura Batata Dextrose e Ágar - BDA (Difco®, USA) e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalsky para obtenção das colônias puras. As placas

foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biologial Oxigen Demand) por 7 dias, a 26 ± 1°C e 14 horas de fotofase. Após esse período, foi feita a raspagem do fungo esporulado nas placas e as suspensões de conídios preparada utilizando água destilada estéril com 0,05% de espalhante adesivo (Tween® 80). A contagem de conídios em câmara de Neubauer foi realizada a partir da diluição da suspensão original, de cada um dos vinte e quatro isolados, para a padronização da suspensão na concentração de $1x10^8$ conídios/mL. Uma alíquota da suspensão original foi retirada para verificar a viabilidade dos conídios. Para isso, 150 µL das suspensões fúngicas foram inoculadas em placas de Petri tipo Rodac™ (60 x 10mm; Falcon) contendo 5 mL de meio de cultura B.D.A. (Difco®) com antibiótico Pentabiótico (5 mg/L) e 10 µL/L do fungicida Derosal®, cobrindo os quatro quadrantes centrais. As placas permaneceram abertas no fluxo laminar até a evaporação da água, que ocorreu por volta de 10 minutos e posteriormente as mesmas foram fechadas e incubadas em câmara incubadora tipo B.O.D. (25 ± 1°C, 14 horas de fotofase) por 24 horas. A análise de viabilidade foi efetuada pela contagem direta em microscópio de luz no aumento de 400x focando no centro da placa e totalizou 200 conídios por placa. Os conídios que apresentavam tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao seu diâmetro foram considerados viáveis. Não foram utilizadas suspensões com viabilidades inferiores a 95%.

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, utilizando gemas de cana-de-açúcar da variedade SP80-1842, obtidos do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba/SP. Nesta etapa foram utilizados dois métodos para verificar qual deles confere melhor colonização do fungo e promoção de crescimento, visto que não existe metodologia descrita até o momento para inoculação de microrganismos em cana-de-açúcar.

3.2.1 Inoculação de *Metarhizium* spp. pelo método de aplicação de suspensão direta no solo

Para o método de inoculação por aplicação de suspensão de *Metarhizium* spp. diretamente no solo foi utilizada a metodologia adaptada de Lanza, Monteiro e Malheiros (2004). Além dos 24 isolados de *Metarhizium*, foi utilizado como controle positivo o isolado ESALQ-1306 de *T. harzianum* (apresenta ação como inoculante para promoção de crescimento e antagonismo a doença) e o controle negativo que apresentou somente água, totalizando 26 tratamentos, cada um contendo 3 repetições. Este ensaio foi repetido duas vezes no tempo.

As gemas de cana-de-açúcar foram esterilizadas superficialmente antes da sua utilização, a fim de evitar contaminação por fungos ou bactérias. Estas foram imersas em água destilada estéril por 30 minutos, em uma solução de hipoclorito de sódio a 4% três vezes por 5 minutos e em seguida, foram lavadas 3 vezes com água destilada estéril. Para o plantio, tubetes plásticos foram preenchidos com 80g de substrato (Topstrato HT - Vida Verde Tecnologia em Substratos®) sem esterilização, deixados em repouso por 3h para estabilização, e em seguida 1mL de uma suspensão de $1x10^8$ conídios/mL foi inoculada em toda a superfície do mesmo. Em cada tubete foi plantada uma gema, permanecendo por 20 dias em casa-de-vegetação com entrada de ar forçada e resfriamento/umidificação tipo pad-fan (Van der Hoeven - Estufas Agrícolas) irrigados diariamente.

3.2.2 Inoculação de *Metarhizium* spp. pelo método de imersão de gemas em suspensão

A condução do experimento de inoculação pelo método de imersão de gemas em suspensão foi realizada conforme metodologia adaptada de Tefera e Vidal (2009).

As suspensões fúngicas foram preparadas conforme descrito no item 3.2 e consistiu dos mesmos tratamentos e repetições descritos para o método de inoculação por aplicação direta no solo. As gemas foram esterilizadas superficialmente conforme descrito anteriormente, dispostas em um Becker de 500 mL e cobertas por 250 mL de suspensão ($1x10^8$ conídios/mL) dos seus respectivos tratamentos. Após 30 minutos que as gemas ficaram submersas na suspensão, foram retiradas do recipiente e o excesso de água foi retirado com auxílio de papel absorvente. Foram então, colocadas nos tubetes (1 gema/tubete) contendo 80g de substrato (Topstrato HT - Vida Verde Tecnologia em Substratos®), sem esterilização. Os tubetes foram mantidos em casa-de-vegetação por 20 dias irrigados diariamente.

3.2.3 Avaliação da promoção de crescimento de cana-de-açúcar

As avaliações do tamanho da parte aérea (folhas e caule) e peso úmido e seco das raízes das plantas foram realizadas após 20 dias do plantio das gemas nos tubetes, para ambos os métodos de inoculação do fungo.

Para a avaliação do tamanho da parte aérea foi utilizada a metodologia descrita por Khan (2012) modificada. Para tanto, as plantas foram esticadas sob uma superfície plana de madeira e o comprimento foi medido com o auxílio de uma régua milimetrada a partir da base da gema até a ponta da maior folha da planta. O tamanho foi registrado em centímetros para todas as repetições de cada tratamento.

Plantas foram retiradas dos tubetes sendo o solo aderido às raízes removido para a avaliação do peso úmido e seco. As raízes foram cortadas dos toletes com uma tesoura e o peso úmido (mg) medido em balança digital de precisão. Para o parâmetro de peso seco, as mesmas amostras foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio de 10x10 cm e levados à estufa de secagem por 24 horas a 50°C. Após este período, as raízes foram novamente pesadas em balança digital para a obtenção do peso seco.

3.2.4 Avaliação da recuperação de *Metarhizium* spp. de tecidos da planta de cana-de-açúcar e avaliação do teor de clorofila

Nos ensaios para determinar a colonização endofítica dos isolados de *Metarhizium* spp. nos tecidos da planta e nos estudos sobre o efeito da inoculação do fungo no teor de clorofila A, B e total das plantas foi utilizado somente o método de inoculação por aplicação das suspensões fúngicas diretamente no solo.

3.2.4.1 Colonização e persistência de *Metarhizium* spp. em tecidos de plantas de cana-de-açúcar

Para os ensaios de verificação da colonização endofítica e persistência de *Metarhizium* spp. em mudas de cana-de-açúcar foram utilizados 11 isolados sendo seis isolados de *M. anisopliae* (ESALQ43, ESALQ1604, ESALQ1610, ESALQ1615, ESALQ1617 e ESALQ1669), um de *M. robertsii* (ESALQ1635), três de *Metarhizium* sp. indet. 1 (ESALQ1637, ESALQ1638 e ESALQ1739) e um de *Metarhizium* sp. indet. 4 (ESALQ1784), por terem apresentado bons resultados de crescimento da parte aérea (folhas e caule) e peso úmido e seco das raízes das plantas. Suspensões de $1x10^8$ conídios/mL + 0,05% Tween 80 de cada um dos isolados selecionados foram inoculadas por aplicação direta no solo onde foram colocadas as gemas. No tratamento controle foi adicionado somente água e o isolado ESALQ1306 de *T. harzianum* também foi utilizado como comparativo.

A metodologia de recuperação dos isolados a partir dos tecidos das plantas foi realizada conforme Araujo et al. (2002) e Greenfield et al. (2015) com adaptações. Aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação e plantio das gemas, amostras de raiz, caule e folhas foram retiradas das plantas e lavadas em água corrente. Essas amostras foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 5 cm e esterilizadas superficialmente. Para isso, as partes vegetais foram submersas em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 3% por 2 minutos para a folha e 4 minutos para caule e raiz, álcool 70% novamente por 30 segundos para folha e 1 minuto para caule e raiz e por fim, em água destilada estéril por 2 minutos. Três

fragmentos de cada uma das partes da planta (raiz, caule e folha) foram transferidos para placas de Petri contendo 15mL de meio de cultura descrito por Behie, Jones e Bidochka (2015), totalizando 5 placas para cada parte da planta e dia de avaliação. O meio de cultura foi composto por batata (200g/L), dextrose (20g/l), ágar (15g/L), Ciclohexamida (0,5g/L), Cloranfenicol (0,2g/L), Dodine 65% (0,5g/L), Cristal violeta (0,01g/L) e H_2O deionizada (1.000mL). As placas foram mantidas em B.O.D. a 25±2°C e 14 horas de fotofase por até 20 dias.

Após este período, colônias de fungos entomopatogênicos de interesse foram identificadas visualmente em nível de gênero com base nos caracteres morfológicos (coloração da colônia) e, quando necessário, lâminas foram preparadas para confirmação em microscópio óptico. A porcentagem de recuperação (PR) foi calculada pelo número de fragmentos colonizados por fungo entomopatogênico (*B. bassiana* e *Metarhizium* spp. analisado separadamente) dividido pelo número total de fragmentos inoculados segundo Araújo et al. (2002).

3.2.4.2 Teor de clorofila em mudas de cana-de-açúcar inoculadas com *Metarhizium* spp.

Para determinação do teor de clorofila A, B e total utilizou-se o medidor de clorofila ClorofiLOG (Modelo CFL 1030 - Falker®) sendo adotado o método não destrutivo. O ClorofiLOG® permite leituras instantâneas do teor relativo de clorofila na folha das plantas amostradas e analisa três faixas de frequência de luz na medição e, através de relações de absorção de diferentes frequências, determina um Índice de Clorofila (FALKER, 2008). A inoculação de *Metarhizium* spp. nas gemas das plantas foi conduzida da mesma forma que a descrita no item anterior (3.2.4.1) utilizando os mesmos isolados de *Metarhizium* sp., além do controle positivo com o isolado ESALQ1306 de *T. harzianum* e o controle negativo somente com água.

As leituras foram realizadas na porção mediana da folha +1 (folha mais jovem que estava totalmente expandida) de 10 plantas (repetições) por tratamento. As mesmas plantas/repetições foram amostradas nos tempos designados (30, 60 e 90 dias) e, para isso, a base do caule das plantas foi identificada com um pedaço de fita adesiva amarela, de modo a amostrar sempre a mesma unidade e com o intuito de ver as diferenças nos níveis de clorofila ao longo dos 90 dias de avaliações.

3.3 Ensaio de promoção de crescimento em campo

Os ensaios de promoção de crescimento de plantas em condições de campo foram conduzidos na Usina Iracema (Grupo São Martinho) em Iracemápolis/SP, utilizando a variedade de cana-de-açúcar SP80-3280.

Os isolados selecionados foram ESALQ1635 (*M. robertsii*), ESALQ1638 (*Metarhizium* sp. indet. 1) e ESALQ1669 (*M. anisopliae*) escolhidos dentre os melhores isolados dentro de cada grupo de espécies de *Metarhizium* nos experimentos em casa-de-vegetação.

Além dos isolados de *Metarhizium* spp., foram utilizados o fungicida comercial Comet® (BASF) (Methyl N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1 H-pyrazol-3-yloxymethyl] phenyl} (N-methoxy) carbamate (Piraclostrobina) que atua como inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias das células dos fungos, inibindo a formação de ATP essencial nos processos metabólicos dos fungos, além de apresentar excelente ação protetiva, devido a sua atuação na inibição da germinação dos esporos, desenvolvimento e penetração dos tubos germinativos e proporcionar maior atividade metabólica da planta, aumento da atividade da enzima nitrato redutase, resultando em melhor sanidade da planta, e o Fertilizante Biozyme TF (Arysta Lifescience), que contém em sua formulação macro e micro nutrientes combinados com extratos vegetais hidrolisados, proporcionando rápido crescimento vegetativo, ajudando a manter o equilíbrio nutricional das plantas.

3.3.1 Plantio de gemas de cana-de-açúcar inoculadas com *Metarhizium* spp.

Neste experimento foram comparados nove tratamentos (Tabela 2). Foram utilizadas 1.000 gemas individualizadas de cana-de-açúcar, produzidas pela Usina Iracema para plantio pelo método de MPB (Muda pré-brotada), para cada um dos tratamentos e o experimento foi repetido duas vezes no tempo.

Tabela 2 – Tratamentos utilizados no experimento de promoção de crescimento de cana-de-açúcar. Os isolados de *Metarhizium* spp. foram pulverizados na concentração de $1x10^8$ conídios/mL.

Tratamentos
T1: Comet® BASF + Biozyme TF- Arysta Lifescience – método utilizado rotineiramente na usina
T2: ESALQ1669
T3: ESALQ1669 + (Comet® BASF + Biozyme TF- Arysta Lifescience).
T4: ESALQ1638
T5: ESALQ1638 + (Comet® BASF + Biozyme TF- Arysta Lifescience).
T6: ESALQ1638 + (Comet® BASF).
T7: ESALQ1635
T8: ESALQ1635 + (Comet® BASF + Biozyme TF- Arysta Lifescience).
Controle: Sem aplicação de produto químico ou biológico.

Os isolados foram produzidos em 5 kg de arroz parboilizado conforme metodologia descrita por Alves (1998) que consiste na esterilização do arroz em autoclave e inoculação de suspensão fúngica com concentração conhecida. O arroz é incubado em B.O.D à 26°C por 7 dias até a esporulação do fungo nos grãos . A concentração de conídios/g de arroz bem como a porcentagem de conídios viáveis foi avaliada antes da utilização no campo. Para a preparação da calda a ser pulverizada em cada tratamento, 500g de arroz + fungo, de cada isolado, foram lavados com água destilada para extrair os conídios do arroz e foram misturados com espalhante adesivo Tween 80 USP (Oxiteno®) para homogeneização da suspensão que apresentava a concentração de $1x10^8$ conídios/mL. Em cada tratamento foi preparado 2L de calda, suficiente para tratar as 1.000 gemas. Nos tratamentos onde se utilizou *Metarhizium* spp. associado aos produtos químicos Comet® e Biozyme TF, uma calda foi preparada a partir da mistura dos dois produtos na concentração de 0,5% conforme bula de aplicação dos fabricantes (0,5L de cada produto para 100L de calda).

Antes da aplicação dos tratamentos, as gemas passaram por tratamento térmico, que consistiu na imersão das mesmas em um tanque de 60 litros contendo água a 52°C durante 30 minutos. Este tratamento é realizado rotineiramente na Usina Iracema como forma de prevenção à doenças e pragas. Após o tratamento, uma telha galvanizada (4,90m X 1,13m) foi coberta com substrato de torta de filtro proveniente do processo industrial da usina e as gemas foram dispostas uma a uma sobre a mesma. Os tratamentos foram pulverizados sobre as gemas com o auxílio de uma bomba costal (Figura 1).

Figura 1 – Disposição das gemas nas telhas e pulverização dos tratamentos com bomba costal.

3.3.2 Transplantio das mudas germinadas para tubetes

Após 10 dias do plantio das gemas, as mudas que germinaram foram retiradas das telhas, contadas e transplantadas para tubetes de 150 mL e dispostas em bandejas plásticas com 54 tubetes cada na área aberta do setor de Qualidade Agrícola da usina. O cálculo da porcentagem de germinação foi realizado para cada tratamento.

As mudas foram irrigadas diariamente durante um periodo de 75 dias até o momento do plantio em campo. Durante este período, foram feitas avaliações:

- Porcentagem sobrevivência das mudas após 15 dias do transplante para os tubetes;
- Crescimento de parte aérea (cm) após 15 dias e 75 dias do transplante para os tubetes;
- Porcentagem de recuperação de *Metarhizium* spp. dos tecidos aos 25 e 75 dias após o plantio

3.3.3 Plantio das mudas de cana-de-açúcar dos tubetes para o campo

Após 75 dias de crescimento das mudas, as mesmas foram retiradas dos tubetes e separadas em caixas plásticas de acordo com os tratamentos designados e mencionados anteriormente na Tabela 2. As mesmas foram plantadas em uma área da Usina Iracema localizada no trecho entre Piracicaba/SP e Limeira/SP na Rodovia Dr. Laércio Corte Km 127.

O plantio das mudas do primeiro experimento ocorreu no mês de junho/2015 e do segundo experimento no mês de novembro/2015 e ocorreu de forma manual, em um terreno de 130m de comprimento x 20m de largura, dividido em 16 linhas de 130m cada. Cada linha foi dividida em partes de 18m cada, sendo 15,5m para o plantio e 2,5m de corredor para separação dos tratamentos. Nas linhas reservadas para plantio (15,5m) as mudas provenientes de cada um dos tratamentos foram distribuídas aleatoriamente, de acordo com o número final de mudas obtido em cada tratamento. O espaçamento entre as mudas que foi de no mínimo 50 cm e no máximo 60 cm de distância entre as mesmas. (Figuras 2).

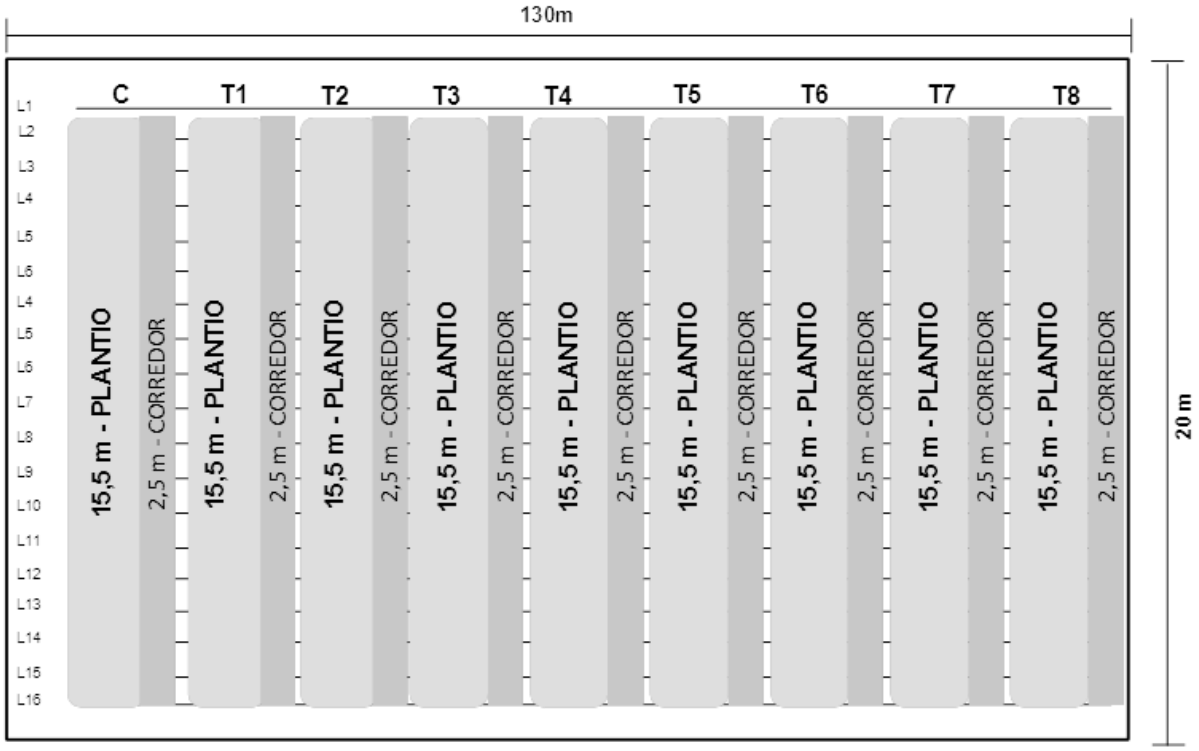

Figura 2 – Delineamento experimental do plantio de mudas de cana-de-açúcar tratadas com *Metarhizium* spp. e produtos químicos após 75 dias de crescimento em tubetes

O perfilhamento das mudas em campo foi avaliado aos 30, 60 e 90 dias após o plantio apenas para o primeiro experimento. Pretende-se dar continuidade na avaliação destas áreas, quantificando a produção do canavial e outros índices de produtividade de açúcares feitos rotineiramente pela usina.

3.4 Bioensaios de patogenicidade e repelência de plantas inoculadas com *Metarhizium* spp. a broca da cana e nematóide

Os efeitos de plantas colonizadas por *Metarhizium* spp. no desenvolvimento e mortalidade da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* e do nematóide *Meloidogyne javanica* foram avaliados em bioensaios em laboratório.

O procedimento de inoculação dos isolados de *Metarhizium* sp. foi realizado conforme descrito no item 3.2.1 pela aplicação de suspensão no solo, utilizando gemas de cana-de-açúcar da variedade SP80-1842. Estas foram plantadas em copos descartáveis de 200 mL contendo 200g de substrato (Topstrato HT) onde foram inoculados 2 mL de suspensão ($1x10^8$ conídios/mL) dos seus respectivos tratamentos. As plantas permaneceram em casa-de-vegetação por um período de 30 a 90 dias para serem utilizadas nos bioensaios posteriormente.

3.4.1 Bioensaio com *Diatraea saccharalis*

Foram utilizados onze isolados de *Metarhizium* sp. relacionados no item 3.2.4.1. Lagartas de *D. saccharalis* foram obtidas do Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, a partir de criação em dieta artificial segundo metodologia descrita por Macedo et al (1983) e seguindo as técnicas de assepsia e de criação de insetos descritas por Parra (1999). Foram selecionadas 5 lagartas de 3° instar para cada repetição totalizando cinco repetições e doze tratamentos (11 isolados de *Metarhizium* e 1 controle com água), totalizando 25 lagartas por tratamento. O experimento foi realizado três vezes no tempo.

As lagartas foram separadas em placas de Petri e acondicionadas em B.O.D. a 26°C±1 para aclimatação por 24 horas, sem alimentação. Após esse período foram colocadas nas plantas (30 dias após a inoculação com isolados de *Metarhizium* spp. para o primeiro e segundo experimento e 45 dias para o terceiro experimento), e confinadas em gaiolas de plástico de polietileno. As gaiolas permaneceram em sala climatizada a 26 ±1°C e 50% U.R durante 20 dias, onde as lagartas permaneceram em contato e se alimentando das plantas inoculadas com o fungo. Ao final deste período foram avaliados os seguintes parâmetros: peso das lagartas e mortalidade em relação ao controle.

As lagartas mortas constadas no dia de avaliação foram retiradas das gaiolas, esterilizadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 1% e colocadas em câmara úmida para permitir a esporulação do fungo sob os cadáveres, de modo a confirmar se a mortalidade foi causada por *Metarhizium* sp. ou por outros agentes.

3.4.2 Bioensaio com *Meloidogyne javanica*

Foram utilizados os isolados ESALQ1635 (*M. robertsii*), ESALQ1638 (*Metarhizium* sp. indet. 1) e ESALQ 1669 (*M. anisopliae*) além do controle com água. Os nematóides foram obtidos no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP onde eram mantidos em raízes de plantas de tomates, segundo a metodologia descrita por HUSSEY e BARKER (1973). Os mesmos foram quantificados com o auxílio de uma lâmina de Peters em microscópio comum. O experimento foi conduzido em vasos de 250 ml contendo substrato (Topstrato HT) e um muda de cana-de-açúcar, sendo que no primeiro experimento as mudas estavam com 30 dias e no segundo experimento com 50 dias pós-plantio e inoculação. Em cada vaso foram transferidos 3.750 ovos dos nematóides. Foram realizadas cinco repetições por tratamento e o ensaio foi repetido duas vezes no tempo.

As plantas foram mantidas em B.O.D à 25°C±1 e irrigadas diariamente por 30 dias até o momento das avaliações. O experimento foi avaliado ao final deste período através da contagem das massas de ovos dos nematóides extraídas das raízes pelos métodos de Jenkins (1964) e Coolen e D'Herde (1972). O resultado foi obtido em número de massa de ovos/g de raiz.

3.5 Experimentos de antagonismo de *Metarhizium* spp. aos fitopatógenos *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*

Os ensaios da capacidade antagônica de *Metarhizium* spp. a *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum* foram realizados através do cultivo pareado dos microrganismos "in vitro" em placas de Petri descartáveis de plástico 90 x 15mm com e sem divisão (2 compartimentos) para avaliar a produção de compostos antagônicos e sua dispersão no meio e produção de voláteis. Também foi conduzido um estudo onde o cultivo dos microrganismos foi realizado em meio liquido.

3.5.1 Antagonismo em cultivo pareado "in vitro"

O objetivo deste experimento foi observar a inibição do crescimento dos fitopatógenos causadores da doença podridão-vermelha em cana-de-açúcar por diferentes isolados e espécies de *Metarhizium.* Foram utilizados vinte e quatro isolados de *Metarhizium* spp. (Tabela 1) também selecionados para os ensaios de promoção de crescimento em casa-de-vegetação, com o intuito de comparar a capacidade de antagonismo com a capacidade de promover o crescimento , associando a origem (solo, raiz e inseto) e a espécie do fungo. Cada isolado constituiu de um tratamento com 5 repetições, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri. O experimento foi repetido três vezes no tempo para os dois fitopatógenos testados.

Em cada placa de Petri (90 x 15mm sem divisão) contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA Difco USA) acrescido de 0,5 g.L de antibiótico (Pentabiótico veterinário reforçado, Fort Dodge R Saúde animal LTDA) foi inoculado um disco de micélio com 0,7 cm de diâmetro de cada isolado de *Metarhizium* sp. Após 5 dias do crescimento de *Metarhizium* spp. em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 26°C, um disco (0,7 cm) de um dos fitopatógenos (*F. moniliforme* ou *C. falcatum*) foi inoculado na outra extremidade da placa, segundo metodologia adaptada de Sasan e Bidochka (2013). *Trichoderma harzianum* foi utilizado como controle positivo, sendo testado para os dois fitopatógenos. O

desenvolvimento dos fungos (*Metarhizium* spp., *F. moniliforme*, *C. falcatum* e *T. harzianum*) isoladamente foi também quantificado.

Após a inoculação dos fungos, as placas foram mantidas em BOD (26°C) por mais 10 dias para a observação do antagonismo. A avaliação do diâmetro das colônias tanto dos isolados de *Metarhizium* spp. como dos fitopatógenos, foram realizada após 5, 7 e 10 dias da inoculação do fitopatógenos. O cálculo da porcentagem de inibição foi feito utilizando a fórmula: **% de Inibição = [(C-T)/C]x100**, onde C é a medida do diâmetro dos controles (cultivo isolado do fungo) e T a medida do diâmetro dos fungos nos tratamentos (cultivo dos fungos concomitante), de acordo com Sasan e Bidochka (2013). Uma avaliação categórica para o antagonismo foi feita utilizando a escala descrita por Bell (1982) com adaptações (Tabela 3).

Tabela 3 – Tipo de controle ou antagonismo por categoria. Adaptada de Bell (1982)

Categoria	Controle/Antagonismo
Categoria A	Sem nenhum controle, o fungo fitopatogênico cresce por cima do *Metarhizium* (0);
Categoria B	O fungo fitopatogênico cresce até o limite da colônia de *Metarhizium*, mas não por cima desta (+);
Categoria C	Há a formação do halo de inibição e este se mantém por todo o período de incubação (++);
Categoria D	Há o retardo no desenvolvimento micelial do fitopatógeno, mas no fim do período de incubação o mesmo se desenvolve por cima de *Metarhizium* (+/-);
Categoria E	Total controle, o fungo *Metarhizium* cresce por cima do fitopatógeno (X).

3.5.2 Avaliação do antagonismo por voláteis

O objetivo deste experimento foi observar se o antagonismo é mediado pela presença de voláteis liberados por *Metarhizium* spp. que possivelmente estariam envolvidos no controle os fitopatógenos sem contato entre os mesmos.

Foram selecionados onze isolados que apresentaram resultados positivos no experimento anterior (item 3.5.1) sendo eles, ESALQ1604, ESALQ1610, ESALQ1614, ESALQ1617 e ESALQ1669 de *M. anisopliae*, ESALQ1618, ESALQ1622, ESALQ1629 e

ESALQ1635 de *M. robertsii* e ESALQ1660 e ESALQ1684 de *Metarhizium* sp. indet. 4. Cada isolado constituiu de um tratamento sendo utilizado 5 repetições sendo cada repetição uma placa de Petri descartável de plástico 90 x 15mm com divisão (2 compartimentos). O experimento foi repetido três vezes no tempo. A forma de inoculação dos isolados e avaliação do diâmetro das colônias foi realizada conforme descrito no item 3.5.1., porém neste experimento foi observado se a presença de *Metarhizium* no lado oposto da placa seria capaz de inibir o crescimento das colônias dos fitopatógenos.

3.5.3 Avaliação do antagonismo em meio liquido

Os tratamentos utilizados neste ensaio foram os mesmos que no item 3.5.2 e o objetivo foi testar se o inóculo de *Metarhizium* poderia inibir o crescimento das células ou esporos dos fungos *F. moniliforme* e *C. falcatum*. Os isolados de *Metarhizium* spp. foram inoculados na forma de um disco de crescimento ativo de 0,7 cm em Erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido BD (Batata, 200g/$L^{-1;}$ Dextrose 20g/L^{-1}) e mantidos em agitador (incubadora refrigerada tipo Shaker - MARCONI®, Modelo: MA 830) a 25 ±1°C, 220 rpm por 5 dias para a obtenção de $1x10^7$ blastosporos/mL^{-1}.

Em seguida, em um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido BD foram adicionados uma alíquota de 1 mL ($1x10^7$ blastosporos/mL^{-1}) de cada um dos fitopatógenos (*F. moniliforme* e *C. falcatum*) previamente crescidos em meio líquido e 100µL da cultura contendo $1x10^7$ blastosporos/mL^{-1} de cada isolado de *Metarhizium* spp. testado. Os fracos foram mantidos em agitação constante a 25 ±1°C, 220 rpm durante 5 dias. Cada tratamento consistiu de 5 repetições representadas por Erlenmeyers. O experimento foi repetido três vezes no tempo.

As avaliações foram realizadas após 5 dias da inoculação dos fitopatógenos com cada isolado de *Metarhizium* spp. Lâminas das culturas foram preparadas colocando 20 µL de cada amostra/Erlenmeyer, cobertas por lamínulas e observadas em microscópio Carl Zeiss (Modelo Axioscop 20) equipado com câmera digital, com o qual foi feita a captura das imagens obtidas e o objetivo foi observar se há inibição da germinação dos fitopatógenos na presença de *Metarhizium*.

3.5.4 Experimento de cultivo pareado "in vitro" entre *Metarhizium* spp. e *Trichoderma harzianum*

Este experimento foi realizado com o intuito de observar a interação (antagonismo, compatibilidade, inibição) entre isolados de *Metarhizium* spp. e *T. harzianum*. *T. harzianum* é

um fungo comumente encontrado em solo e usado comercialmente em larga escala no tratamento de sementes. Este fungo também é utilizado em cana-de-açúcar como antagonista de fitopatógenos, sendo assim o experimento também teve como objetivo a seleção de espécies de *Metarhizium* compatíveis com *T. harzianum* de forma que possa se estudar a possibilidade de co-inoculação ou da formulação conjunta de ambos fungos, com o intuito de usufruir dos benefícios promovidos nas plantas. Foram utilizados 24 isolados de *Metarhizium* spp. (Tabela 1) e o isolado ESALQ1306 de *T. harzianum*. Os fungos foram inoculados em placas de Petri conforme descrito no item 3.5.1 (cultivo pareado). As placas controle consistiram de apenas um disco (0,7 cm) de cada um dos isolados de *Metarhizium* spp. e do fitopatógeno *T. harzianum*. Cada isolado constituiu de um tratamento com 5 repetições sendo cada repetição um placa de Petri. O experimento foi repetido três vezes no tempo.

Primeiramente foi feita a inoculação de *Metarhizium* spp. e 5 dias após a de *T. harzianum*. O diâmetro das colônias tanto dos isolados de *Metarhizium* spp. quanto de *T. harzianum* foram medidos após 5, 7 e 10 dias da inoculação de *T. harzianum*. Após a inoculação dos fungos, as placas foram mantidas em BOD (26°C). Para a avaliação da presença de antagonismo foi utilizada a escala descrita por Bells (1982) com adaptações, conforme Tabela 3.

3.6 Ensaios de métodos qualitativos para determinação de características fisiológicas associadas à função de promoção de crescimento e antagonismo de *Metarhizium* spp.

Testes qualitativos “in vitro” foram realizados para complementar e elucidar os resultados obtidos nos ensaios de promoção de crescimento e antagonismo. O emprego destes testes pode ser útil por representarem técnicas simples e com resultados rápidos e confiáveis, importantes no processo de seleção de isolados com características de interesse biotecnológico do ponto de vista dos parâmetros estudados nos experimentos anteriores.

3.6.1 Verificação da capacidade de produção de ß-1,3-Glucanase pelos isolados de *Metarhizium* spp.

A verificação da capacidade dos isolados de *Metarhizium* sp. produzir a enzima hidrolítica ß-1,3-Glucanase foi verificada por meio da metodologia adaptada de Henwick et al. (1991) que baseia-se na detecção da hidrólise da ß-1,3-Glucanase através da reação colorimétrica com o corante vermelho do Congo. Foram utilizados neste experimento 24 isolados de *Metarhizium* sp. descritos na Tabela 1 e o isolado ESALQ1306 de *T. harzianum*.

Placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200g/L batata, 20g/L dextrose, 15g/L ágar, 4mg/L laminarina 0,5%) foram preparadas e no seu centro foi inoculado um disco (0,7 cm) de cada isolado estudado. As placas foram incubadas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 25±1°C por 10 dias. Após este período, a superfície do meio foi coberta com uma solução à base do corante vermelho do Congo (0,5%) durante 90 minutos para a revelação de um halo de degradação da laminarina ao redor das colônias, visto que esse corante se liga à laminarina e onde ocorreu a degradação da mesma o meio não é corado, indicando a produção de ß-1,3-Glucanase. Para cada isolado foram usadas 5 repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri. O experimento foi repetido três vezes no tempo.

3.6.2 Verificação da capacidade de produção de Sideróforos pelos isolados de *Metarhizium* spp.

Os ensaios de detecção da produção de Sideróforos por *Metarhizium* spp. foram realizados conforme metodologia de Schwyn e Neilands (1987). Sideróforo é um composto orgânico que atua na captação de ferro pelos organismos. Foram utilizados, neste experimento, 24 isolados de *Metarhizium* sp. mencionados na Tabela 1. Um disco (0,7 cm) de crescimento ativo de cada um dos fungos foi inoculado em frasco de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura líquido BD. Os frascos foram mantidos em constante agitação (220 RPM) durante 5 dias em agitador a 25 ±1°C. Uma solução indicadora de cromo azurol S (CAS) foi preparada a partir da mistura das soluções A (cromo azurol S: 12,2 mg; água destilada: 10 mL), B (HCl concentrado: 84µL; água destilada: 100 mL; $FeCl_3.6\ H_2O$: 27 mg), C (HDTMA: 21,9 mg; água destilada: 25 mL) e D (Piperazina anidra: 4,31g; água destilada: 40 mL) em um balão volumétrico, completando o volume para 100 mL com água destilada. Após este período, uma alíquota (1 mL) de cada Erlenmeyer foi retirada, transferida para tubos Eppendorf e centrifugada a 9.500*g* por 5 minutos para a coleta do sobrenadante. 100 µL do sobrenadante, de cada tratamento, foi disposto em microplacas de cultivo juntamente com 100 µL da solução indicadora de Cromo Azurol S. Após 30 minutos, as placas foram avaliadas de acordo com a coloração amarelo ou laranja que indica a produção de sideróforos pelos isolados. O processo baseia-se no princípio de que o complexo cromo azurol mais ferro assume originalmente a coloração azul escura quando adicionado no meio e quando o ferro é retirado pelo sideróforo, o corante cromo azurol muda de cor, tornando-se amarelo ou alaranjado.

Cada isolado constituiu de um tratamento formado por 3 repetições e no tratamento controle nos Erlenmeyers foram mantidos apenas meio BD sem fungo. O experimento foi repetido três vezes no tempo.

3.7 Análises estatísticas

Para o experimento de avaliação do Índice de clorofila de plantas tratadas com *Metarhizium* spp. após 30, 60 e 90 dias da inoculação em casa-de-vegetação foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, assim como para o parâmetro de tamanho de parte aérea das plantas inoculadas nos ensaios de campo. Foi utilizado o programa estatístico ASSISTAT versão 7.7 Beta (04-10-2015).

A análise do perfilhamento das mudas tratadas com o fungo e plantadas em campo, também foi feita com o programa ASSISTAT versão 7.7 Beta (04-10-2015). Foi realizada análise de variância (ANOVA) (delineamento inteiramente casualizado) aplicando o teste de Tukey ao nível significância de 5% para as comparações entre as médias, sendo os tempos de avaliação de 30, 60 e 90 dias analisados separadamente.

Também foi analisada a porcentagem de inibição dos fitopatógenos *F. moniliforme* e *C. falcatum* mediada pelos isolados de *Metarhizium* spp. através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, separando os tratamentos de acordo com os grupo de espécies de *Metarhizium* (*M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M.* sp. indet.1, 2 e 4).

Para o experimento com nematóide *M. javanica* foi realizada uma análise de variância com nível de significância de 0,05 para o teste F. Logo em seguida, foi feito um teste Tukey, ao nível de 0,05 de significância, para as comparações múltiplas entre as médias dos tratamentos caso houvesse efeito de tratamento e o software utilizado para as análises foi o software livre R versão 3.2.2 (2015-08-14).

No experimento com lagartas de *D. saccharalis*, tanto para a análise da mortalidade total como da mortalidade confirmada foi realizada a análise de variância (ANOVA) (delineamento inteiramente casualizado) e foi aplicado o teste de Tukey ao nível significância de 5% para as comparações entre as médias, sendo que cada experimento (três repetições no tempo) foi considerado como uma repetição para cada tratamento. Para a análise de peso final de lagartas, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando cada experimento como uma repetição e o programa estatístico utilizado foi o ASSISTAT versão 7.7 Beta (04-10-2015).

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio de promoção de crescimento em casa-de-vegetação

4.1.1 Inoculação de *Metarhizium* spp. pelo método de aplicação de suspensão direta no solo e imersão de gemas em suspensão

Com a finalidade de avaliar qual método de inoculação dos isolados de *Metarhizium* resulta em maior crescimento das plantas de cana-de-açúcar foram conduzidos dois experimentos em casa-de-vegetação, onde os isolados do fungo foram inoculados pelo método de inoculação direta das suspensões fúngicas no solo ou pela imersão de gemas em suspensões das mesmas concentrações fúngicas e, após 20 dias, foi avaliado o comprimento da parte área e peso úmido e seco das raízes.

No experimento I, conduzido no mês de janeiro de 2015, as plantas inoculadas com os isolados das espécies indeterminadas de *Metarhizium* apresentaram valores superiores a 35 cm de comprimento, com a exceção do isolado *Metarhizium*. sp. indet. 1 ESALQ1608. Em relação aos métodos de inoculação dos conídios de *Metarhizium* spp. (imersão de gemas ou aplicação de suspensão no solo) não ficou evidente diferenças significativas entre os mesmos (Figura 3A).

As plantas inoculadas com os isolados de *M. robertsii* apresentaram comprimentos que variaram de 14,6 cm a 33,5 cm, e aquelas inoculadas com os isolados de *M. anisopliae* variaram de 11,3 cm a 29,5 cm (Figura 3A). Os isolados de *Metarhizium* sp. indet 1 foram os que mais chamaram atenção (exceto o isolado ESALQ 1608), pois todos resultaram em crescimento acima de 35 cm em ambos métodos de inoculação. Os isolados de *Metarhizium* sp. indet 2 e *Metarhizium* sp. indet 4 também resultaram em elevados crescimento das mudas de cana-de-açúcar. Como controle negativo foi utilizado água e como controle positivo o isolado comercial de *T. harzianum* ESALQ1306, sendo que as plantas destes controles apresentaram valores de comprimento inferiores a 15 cm para ambos dos métodos (Figura 3A).

Quanto ao peso úmido e seco das raízes, foi observado que aparentemente o método de imersão das gemas resultou em valores superiores, embora com grande variância, para a maioria dos tratamentos em comparação com o método de aplicação de suspensão no solo (Figura 3 B e C). O peso úmido das raízes alcançou valores elevados para os isolados ESALQ1637 e ESALQ1638 da *Metarhizium* sp. indet 1 e ESALQ1684 da *Metarhizium* sp. indet 4 com 1,14g, 1,34g e 1,29g, respectivamente. O peso úmido de todos isolados de *M. robertsii* variou entre 0,18g (ESALQ1635) e 1,08g (ESALQ1426) e para os isolados de *M.*

anisopliae a variação foi de 0,1g (ESALQ1604) a 1,03g (ESALQ1669) (Figura 3B). Valores maiores do que 0,3g de peso seco foram obtidos apenas nos isolados ESALQ43, ESALQ1037, ESALQ1604, ESALQ1615 de *M. anisopliae* dos isolados de ESALQ1426 e ESALQ1635 de *M. robertsii* e ESALQ1608, ESALQ1637, ESALQ1638 e ESALQ1684 das espécies indeterminadas de *Metarhizium* (Figura 3C).

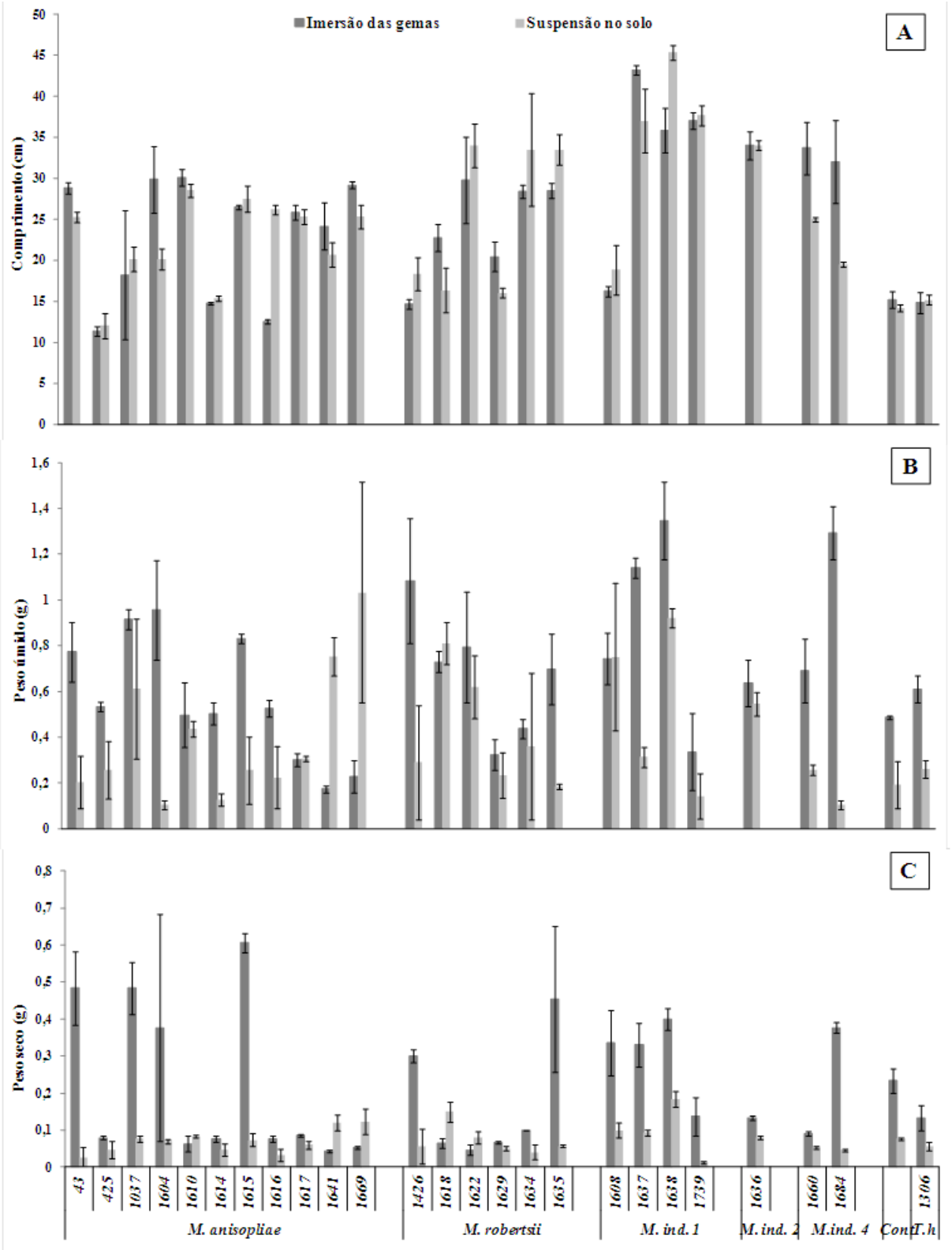

Figura 3 – Comprimento (cm) da parte aérea e peso úmido e seco (g) das raízes de mudas de cana-de-açúcar, inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium* spp. pelos métodos de imersão das gemas e por aplicação de suspensão no solo referente ao Experimento I. *M. ind. 1, 2, 4: Metarhizium*. espécie indeterminada 1; 2; e 4; respectivamente. *Cont*: controle com apenas aplicação de Água e *T.h*: *Trichoderma harzianum*. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

No experimento II, conduzido no mês de fevereiro de 2015, também não ficou evidente diferenças significativas e consistentes no comprimento das partes áreas e o peso seco e úmido das raízes entre os métodos de inoculação de *Metarhizium* spp. (Figura 4). Assim como no experimento I, isolados de *Metarhizium* sp. indet 1 apresentaram um bom desempenho, sendo que dos três isolados que proporcionaram crescimento superior a 30 cm, dois pertencem a esta espécie (ESALQ1637 e ESALQ1739 com 33,0 cm e 34,0 cm, respectivamente) além de *M. anisopliae* ESALQ43 (37,5 cm). Dentre *M. robertsii*, os isolados que resultaram em comprimentos elevados foram ESALQ ESALQ1622 e ESALQ1635 (26,8 cm e 25,2 cm, respectivamente). Em relação ao parâmetro de peso úmido, os isolados que se destacaram foram *M. robertsii* ESALQ1634 (1,2g) e ESALQ1635 (1,1g), os isolados da *Metarhizium* sp. indet 1 ESALQ1637 (1,3g), *Metarhizium* sp. indet 4 ESALQ1660 (0,9g) e ESALQ1684 (0,8g) e *M. anisopliae* ESALQ43 (1,2g), ESALQ425 (0,9g), ESALQ1604 (1,1g), ESALQ1616 (1,0g), ESALQ1617 (1,1g) e ESALQ1669 (0,7g) (Figura 4B). Para o peso seco só se destacaram os isolados de *M. anisopliae* ESALQ43 (0,3g) e ESALQ1669 (0,1g), *M. robertsii* ESALQ1635 (0,15g) e *Metarhizium* sp. indet 1 ESALQ1638 (0,15g), *Metarhizium* sp. indet 4 ESALQ1660 (0,1g) e ESALQ1684 (0,09g) (Figura 4C).

É importante ressaltar que, para os dois experimentos, em geral, isolados provenientes de solo apresentaram maior promoção de crescimento medidos pelo comprimento da parte aérea e também peso seco e úmido das raízes, sendo o isolado ESALQ43 o único vindo de inseto (Hemiptera: Cercopidae) que apresentou bons resultados.

A inoculação do isolado ESALQ1306 de *T. harzianum* resultou em crescimento semelhante ao controle e inferior a vários isolados de *Metarhizium* spp. para os três parâmetros analisados nas mudas de cana-de-açúcar.

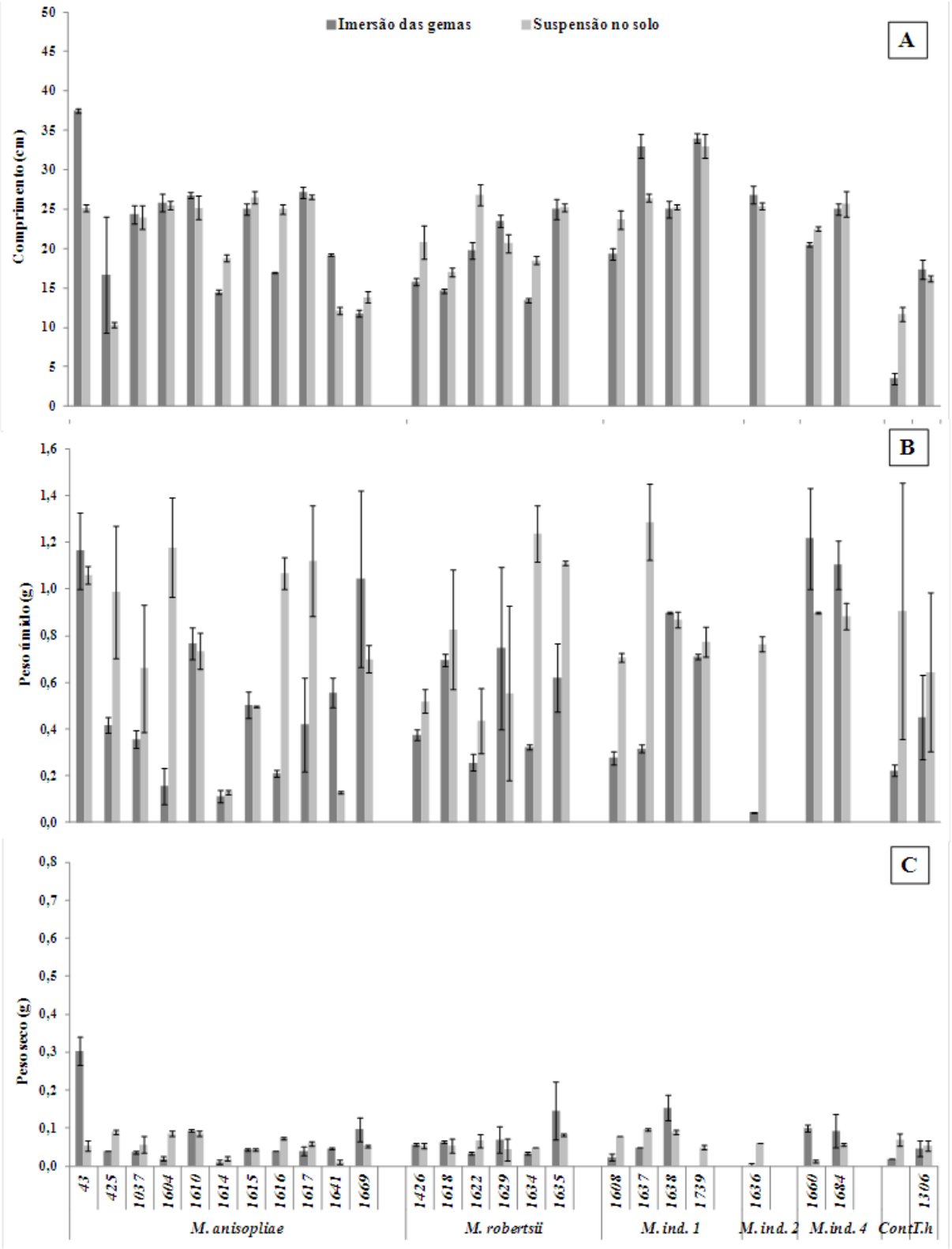

Figura 4 – Comprimento (cm) da parte aérea e peso úmido e seco (g) das raízes de mudas de cana-de-açúcar, inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium* spp. pelos métodos de imersão das gemas e por aplicação de suspensão no solo referente ao Experimento I. *M. ind. 1, 2, 4: Metarhizium*. espécie indeterminada 1; 2; e 4; respectivamente. *Cont*: controle com apenas aplicação de Água e *T.h*: *Trichoderma harzianum*. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

4.1.2 Recuperação de *Metarhizium* spp. de tecidos da planta de cana-de-açúcar e avaliação do índice de clorofila

4.1.2.1 Colonização e persistência de *Metarhizium* spp. em tecidos de mudas de cana-de-açúcar

O método aplicação de suspensão do fungo no solo foi selecionado para os experimentos seguintes para a inoculação de *Metarhizium* em cana-de-açúcar devido ao fato de ser a forma mais simples e por ser o método rotineiramente utilizado para a aplicação de fungicidas e fertilizantes na produção de mudas pré-brotadas e em plantio de cana-de-açúcar.

Constatou-se que 63,64% dos isolados de *Metarhizium* spp. testados colonizaram totalmente as raízes das plantas de cana, ou seja, o fungo foi recuperado em todos os fragmentos (Figuras 5 e 6). Verifica-se também que mesmo após 90 dias da inoculação o fungo estava presente nas plantas, em até 100% dos fragmentos de raízes analisados.

Os isolados que persistiram em 100% das raízes foram os das espécies *M. anisopliae* (ESALQ1604, ESALQ1610 e ESALQ1615), *M. robertsii* (ESALQ1635) e *Metarhizium* sp. indet 1 (ESALQ1638 e ESALQ1739) e *Metarhizium* sp. indet 4 (ESALQ1684).

Vale ressaltar ainda, que todos os isolados que foram capazes de colonizar as raízes das plantas de cana são oriundos de amostras solo, sendo que o único isolado testado proveniente de inseto, ESALQ43 (PL-43 - Hemiptera: Cercopidae), não foi capaz de colonizar as raízes de cana-de-açúcar em nenhuma das três avaliações, apesar de ter conferido bom crescimento de parte aérea e peso úmido e seco para ambos os experimentos de promoção de crescimento (4.11).

O isolado ESALQ1617 (*M. anisopliae*) apresentou cerca de 30% de colonização das raízes e foi recuperado apenas aos 60 dias após o inoculo das plantas. Para alguns isolados observou-se uma diminuição na recuperação de colônias entre 60 (ESALQ1637 e ESALQ1739) e 90 dias (ESALQ1669) após a inoculação dos fungos.

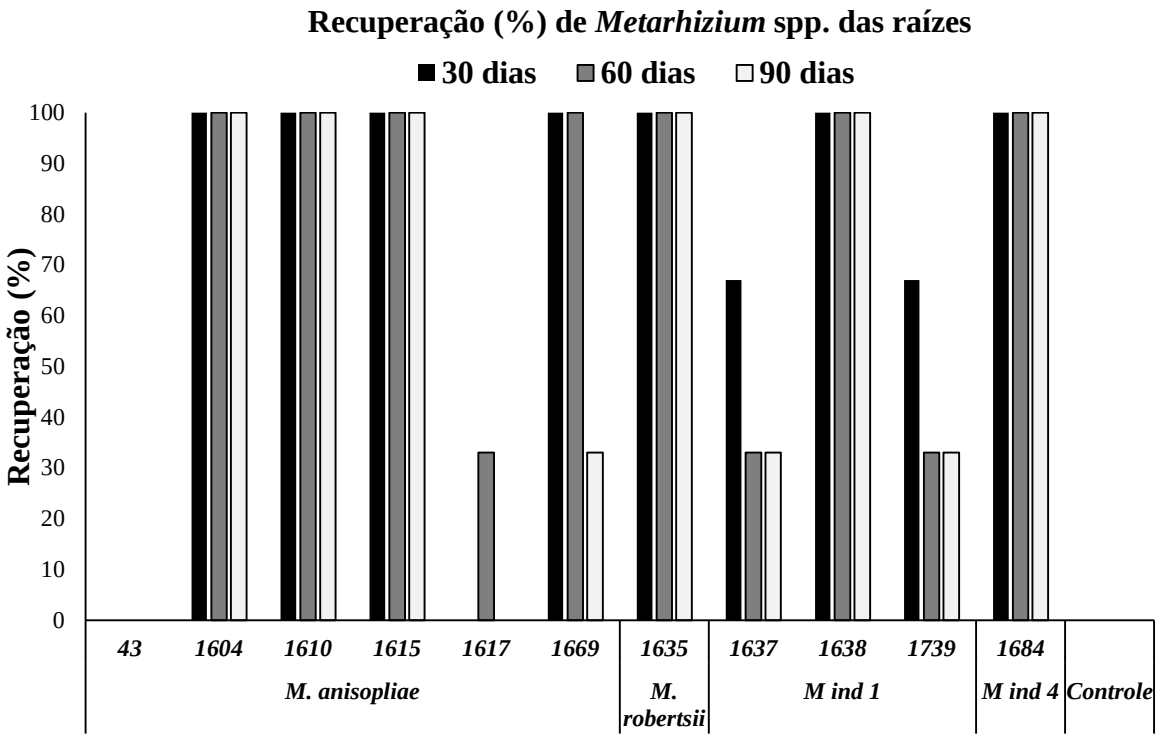

Figura 5 – Recuperação (%) de *Metarhizium* spp. das raízes de mudas de cana-de-açúcar após 30, 60 e 90 dias da inoculação dos isolados. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP

Figura 6 – Aspecto de colônias de *Metarhizium* spp. recuperadas das raízes de mudas de cana-de-açúcar inoculadas com o fungo pelo método de aplicação de suspensão no solo

Não foi possível a recuperação de colônias de *Metarhizium* spp. do caule e das folhas das plantas inoculadas, confirmando que, de fato, o gênero *Metarhizium* está intimamente associado a rizosfera de plantas. No entanto, colônias de *Beauveria* sp. foram recuperadas das folhas e caules das plantas de cana-de-açúcar, tanto as tratadas com *Metarhizium* spp. como as dos controles (inoculadas apenas com água ou com o isolado ESALQ1306 de *T. harzianum*) (Figuras 7 e 8).

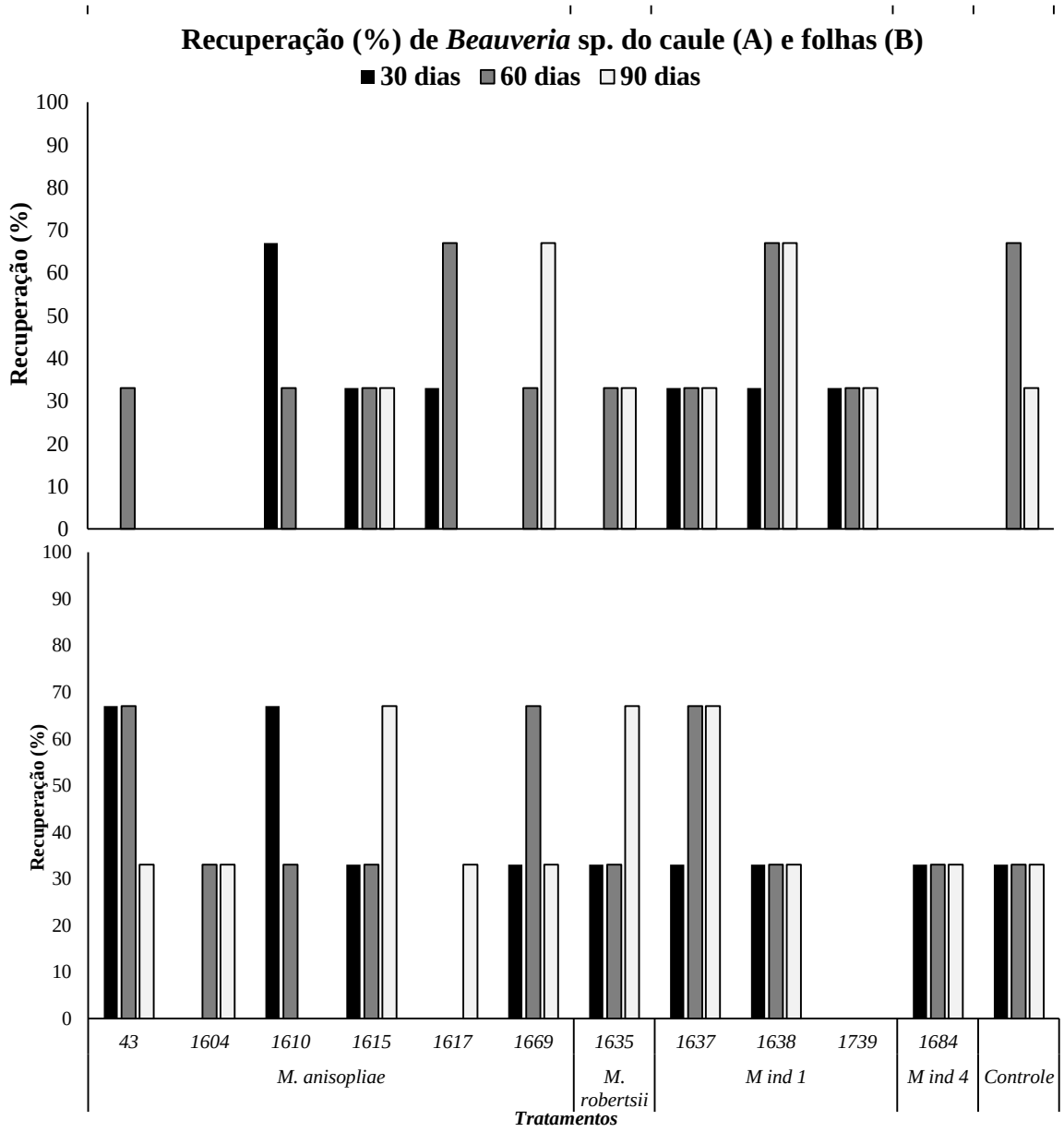

Figura 7 – Recuperação (%) de *Beauveria* sp. do caule e de folhas de cana-de-açúcar após 30, 60 e 90 dias da inoculação dos isolados de *Metarhizium* spp. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP

A porcentagem de recuperação para o caule e as folhas alcançou quase 70%, sendo que as folhas apresentaram maior número de amostras com *Beauveria* sp.

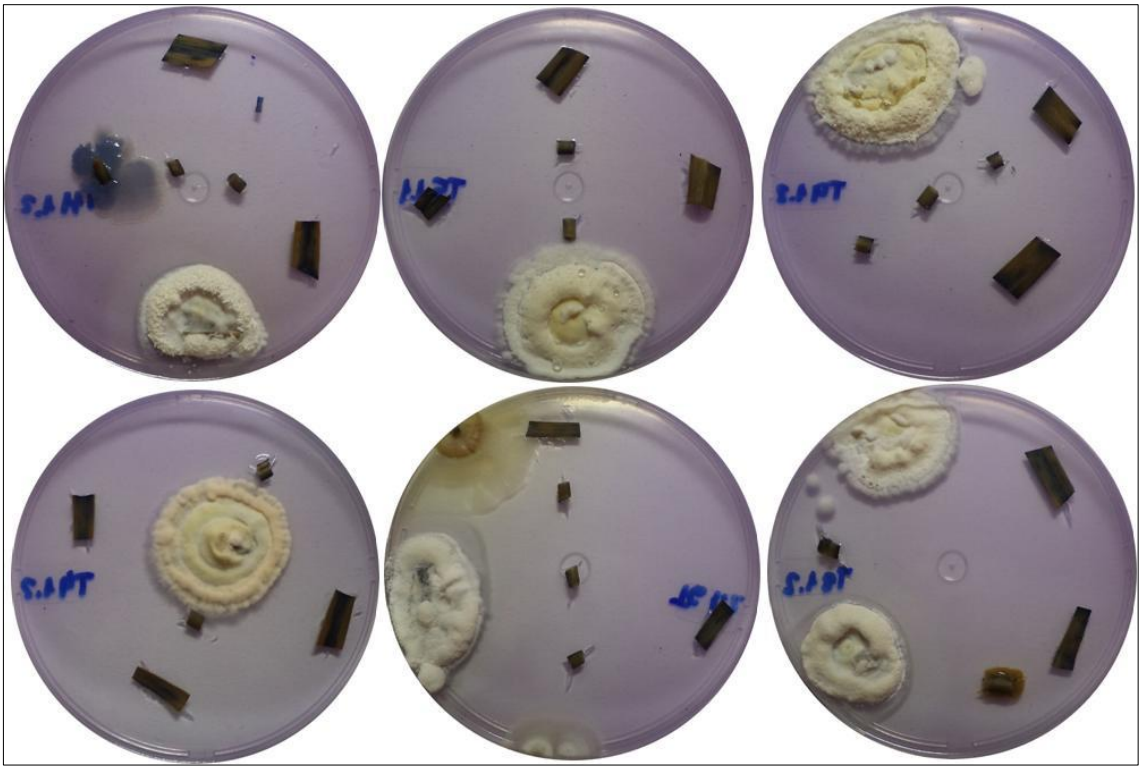

Figura 8 – Aspecto das colônias de *Beauveria* sp. recuperadas do caule e das folhas de mudas de cana-de-açúcar inoculadas com o *Metarhizium* spp. pelo método de aplicação de suspensão no solo

4.1.2.2 Teor de clorofila das mudas de cana-de-açúcar inoculadas com *Metarhizium* spp.

Outro fator avaliado nas plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Metarhizium* spp. foi o índice de clorofila das folhas. Os dados obtidos foram apresentados separadamente por clorofila A, B e total. Este pigmento exerce controle dominante sob a quantidade de radiação solar que uma folha absorve, deste modo as concentrações de clorofila foliar apresentam um relação direta com as taxas fotossintéticas, que é fortemente relacionada à produtividade.

Os resultados obtidos mostram que não houve diferença nos teores de clorofila das folhas de mudas inoculadas com *Metarhizium* spp., em relação aos controles (ESALQ1306 e água) ao longo dos 90 dias de avaliações (Figura 9). Os teores de clorofila foram semelhantes aos 30, 60 e 90 dias independentemente do isolado inoculado. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas, os valores de clorofila B do controle foram 1,43x vezes em relação aos valores observado nas mudas inoculadas com o isolado ESALQ1617 de *M. anisopliae*.

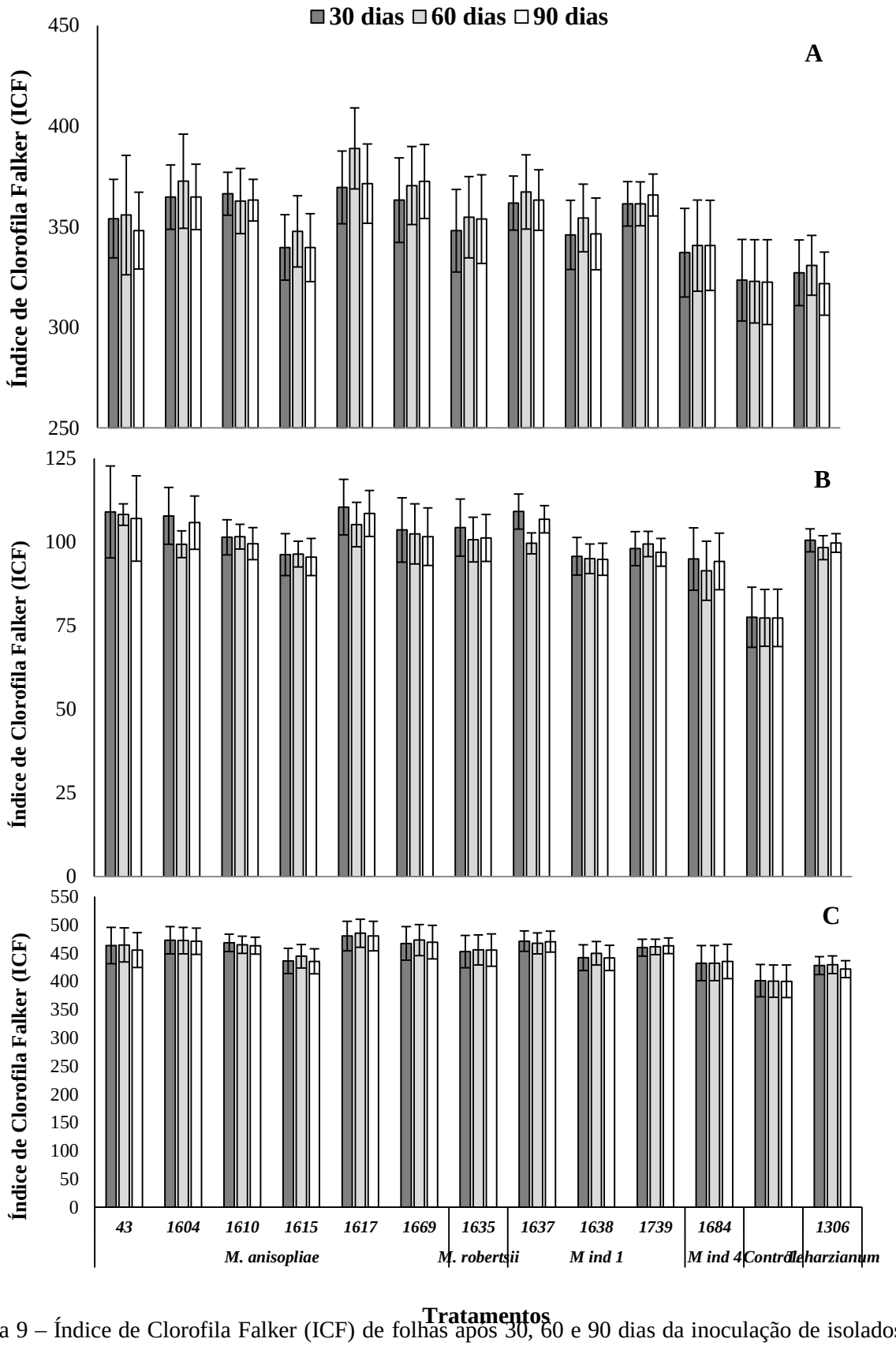

Figura 9 – Índice de Clorofila Falker (ICF) de folhas após 30, 60 e 90 dias da inoculação de isolados de *Metarhizium* spp. (A) clorofila A, (B) clorofila B e (C) clorofila Total (A+B) Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. Não foi observado diferença significativa para nenhum dos parâmetros e data de avaliação pela análise de variância

4.2 Ensaio de promoção de crescimento em campo

4.2.1 Plantio de pré-germinação de cana-de-açúcar inoculada com *Metarhizium* spp.

Após o plantio das gemas de cana-de-açúcar para a obtenção de mudas pré-brotadas (MPB) foram realizadas avaliações referentes a germinação e estágio de desenvolvimento das mudas 10 dias após o plantio nas telhas. Este parâmetro é importante pois um dos desafios da produção de cana-de-açúcar pelo método MPB é conseguir aumentar o número de mudas viáveis que chegarão até o campo, sendo que aquelas que não germinam ou não se desenvolvem bem têm grandes chances de não sobreviver até o momento do plantio no canavial. A sobrevivência ou pegamento de mudas foi avaliado após 25 dias do plantio nas telhas. Este é o parâmetro mais importante pois consiste no número de mudas sobreviventes que vão ser de fato plantadas em campo. Neste caso, o desafio da produção por MPB se dá em alcançar a menor mortalidade de mudas e, assim, menor gasto de dinheiro com a produção das mesmas.

No primeiro experimento (maio de 2015), alguns dos tratamentos com inoculação dos fungos apresentaram germinação superior ao tratamento rotineiramente utilizado na usina que consiste apenas no uso de produtos químicos (Figura 10).

Os tratamentos que apresentaram maior germinação no primeiro experimento 1 foram ESALQ1669 (*M. anisopliae*) + produtos Comet® e Biozyme TF (577 mudas de 1000 gemas plantadas), ESALQ1635 (*M. robertsii*) isoladamente e em conjunto com os produtos (540 mudas cada), Comet® e Biozyme TF (520 mudas) e ESALQ1638 (*Metarhizium* sp. indet. 1) + produtos (512 mudas).

Apesar de todos estes tratamentos terem apresentado boa germinação, apenas os tratamentos com o isolado ESALQ1635 (*M. robertsii*) isoladamente e em conjunto com os produtos químicos testados, apresentaram um maior número de mudas em estágio acelerado de desenvolvimento, ou seja, brotadas e já apresentando folhas.

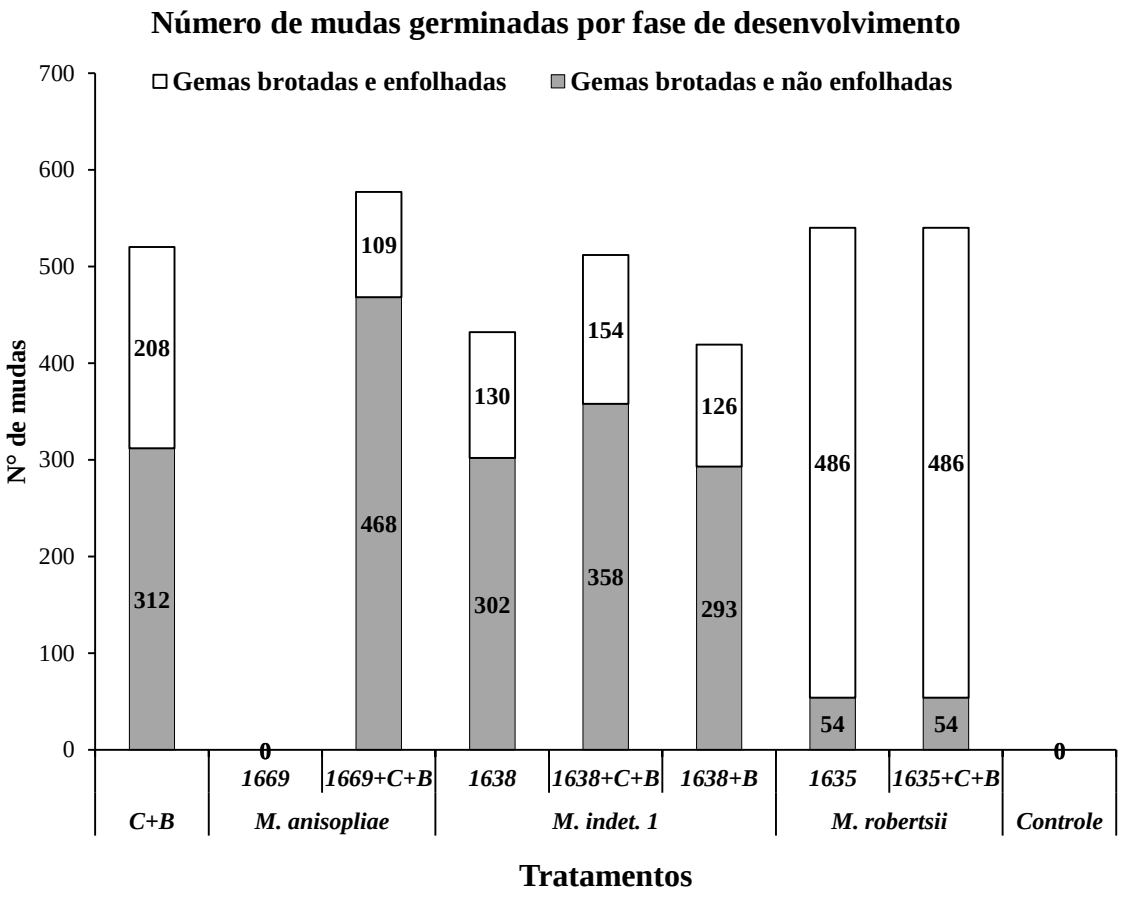

Figura 10 – Número de mudas de cana-de-açúcar tratadas com isolados de *Metarhizium* spp. por fase de desenvolvimento, Experimento I. N= 1.000 gemas iniciais plantadas. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. *C*: Comet® e *B*: Biozyme TF

As comparações dos isolados ESALQ1638 e ESALQ1635 inoculados com e sem Comet e Biozyme mostraram que estes produtos nem afetaram negativamente os fungos nem resultaram em efeito aditivo ou sinérgico. As gemas inoculadas com *M. anisopliae* ESALQ1669 e as gemas não inoculadas não resultaram em nenhuma muda germinada, o que pode indicar algum problema na instalação do experimento, aquecimento das mudas, etc.

Resultados semelhantes foram vistos no segundo experimento (Julho/2015). Os dados obtidos mostram que a maioria dos tratamentos com inoculação de *Metarhizium* de forma isolada ou em conjunto com os produtos químicos, resultou em uma maior quantidade de mudas enfolhadas (mudas apresentando estágio de desenvolvimento acelerado), tanto em relação ao controle, como ao tratamento apenas com os produtos químicos (Figura 11).

Os tratamentos que apresentaram maior germinação no experimento 2 foram ESALQ1635 (*M. robertsii*) isoladamente e em conjunto com os produtos Comet® e Biozyme TF (960 e 940 mudas respectivamente), ESALQ1638 (*Metarhizium* sp. indet. 1) + Biozyme

TF (930 mudas), ESALQ1638 (*Metarhizium* sp. indet. 1) (920 mudas) e ESALQ1669 (*M. anisopliae*) + produtos) (860 mudas).

Os dados também mostraram que todos os tratamentos com o uso de *Metarhizium* spp. isoladamente ou em conjunto com os produtos químicos, apresentaram aceleração no desenvolvimento das plantas em relação ao tratamento da usina e ao controle (Comet® e Biozyme TF: 840 mudas e sem aplicação: 680 mudas, respectivamente).

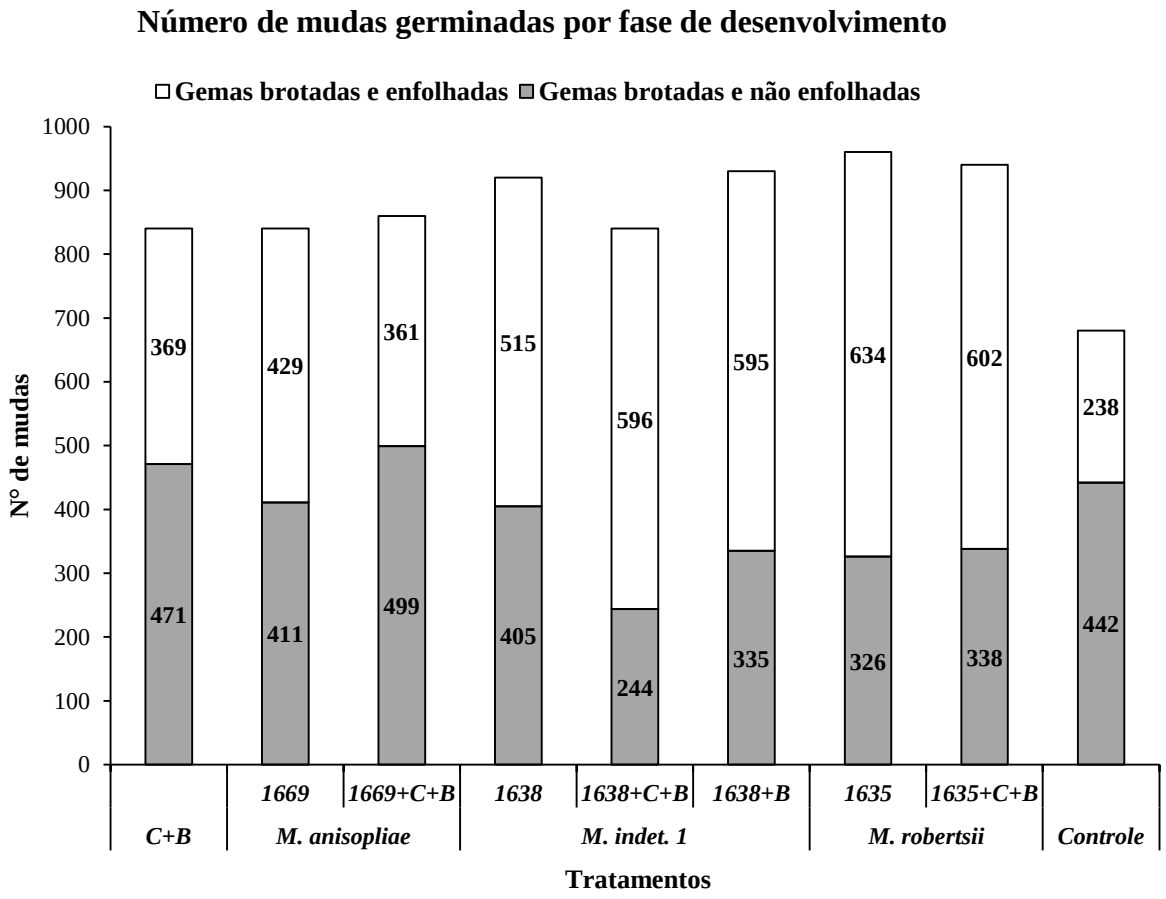

Figura 11 – Número de mudas de cana-de-açúcar tratadas com isolados de *Metarhizium* spp. por fase de desenvolvimento, Experimento II. N= 1.000 gemas iniciais plantadas. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. *C*: Comet® e *B*: Biozyme TF

4.2.2 Transplantio das mudas germinadas para tubetes

Após a avaliação de germinação de mudas e seu estágio de desenvolvimento as mudas foram transplantadas para tubetes e após 15 dias do transplante foram avaliadas quanto a sobrevivência ou pegamento. Tanto no primeiro como no segundo experimento é possível observar que as mudas tratadas com *Metarhizium*, tanto isoladamente como em conjunto com

os produtos Comet® e Biozyme TF, apresentaram maior pegamento e consequentemente menor número de mudas mortas após o transplante em relação ao tratamento apenas com Comet® + Biozyme TF e Controle (sem aplicação) (Figuras 12 e 13).

No primeiro experimento o tratamento apenas com os produtos químicos utilizado rotineiramente pela usina, apresentou 61,5% de pegamento (320 mudas) e 38,5% de morte das mudas (200 mudas) após 15 dias do transplante para os tubetes, enquanto os tratamentos com *Metarhizium* apresentaram pegamento de até 90% (486 mudas) (ESALQ1635 – *M. robertsii* e ESALQ1635 – *M. robertsii* + produtos) e apenas 18% de morte de mudas (76 mudas) para ESALQ1638 – *Metarhizium* sp. indet. 1 + produtos).

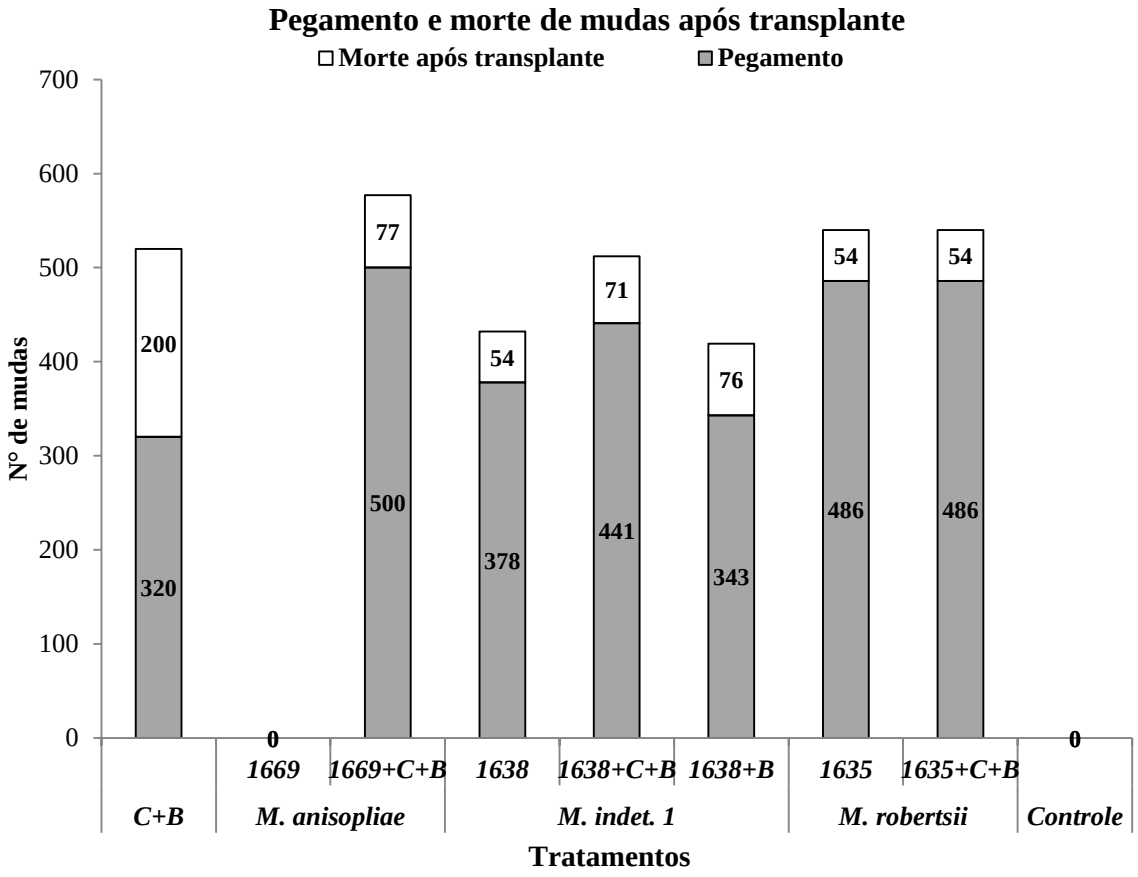

Figura 12 – Número de mudas pegas e mortas por tratamento após 15 dias do transplante para os tubetes. N=1.000 mudas iniciais – Experimento I. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. *C*: Comet® e *B*: Biozyme TF

No segundo experimento o Controle, sem aplicação, apresentou porcentagem de morte de 40% (272 mudas), enquanto o tratamento com Comet® e Biozyme TF apresentou 29%

(244) de morte de mudas apenas, mostrando que o uso destes produtos favorece a sobrevivência das mudas.

Porém, para os tratamentos com isolados de *Metarhizium* spp. a porcentagem de morte foi de 9,4% apenas (ESALQ-1635 + produtos: 94 mudas), mostrando que o uso do fungo pode beneficiar a produção das mesmas e incrementar o uso dos produtos químicos (Figura 13). Em resumo, enquanto o tratamento de gemas rotineiramente usado na usina na produção de mudas pré-brotadas com aplicação de fungicida e fertilizante resultou em pegamento de 32% e 59,6%, apenas com o uso de isolados de *Metarhizium* estes valores foram de até 50% e 86,4%, nos dois experimentos, respectivamente.

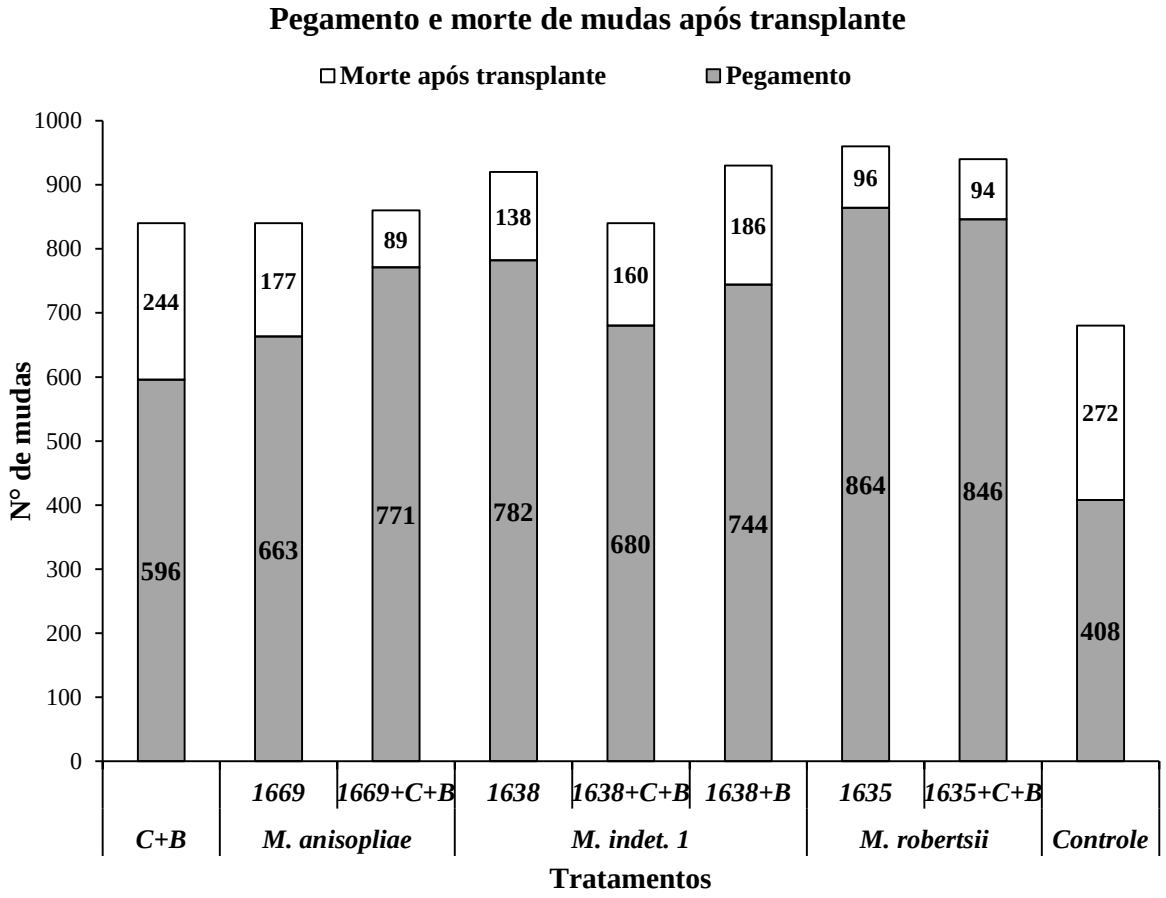

Figura 13 – Número de mudas pegas e mortas por tratamento. N=1.000 mudas iniciais – Experimento II. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. *C*: Comet® e *B*: Biozyme TF

4.2.3 Tamanho de parte aérea e colonização das raízes de cana-de-açúcar tratadas com *Metarhizium* spp.

Ainda em relação aos testes de promoção de crescimento em campo, foi realizada a avaliação do comprimento da parte aérea das mudas tratadas aos 25 e 75 dias após a inoculação (plantio). No primeiro experimento, aos 25 dias após a inoculação das mudas, o tratamento ESALQ1635 com e sem Comet® e Biozyme (CB) foi estatisticamente superior ao tratamento com ESALQ1669 (*M. anisopliae*) + CB. As outras comparações não foram estatisticamente diferentes para o parâmetro de crescimento.

No segundo experimento, 25 dias após a inoculação, apenas os tratamentos ESALQ1635 com e sem CB e ESALQ1638 +B foram estatisticamente superiores aos controles em relação ao comprimento da parte aérea.

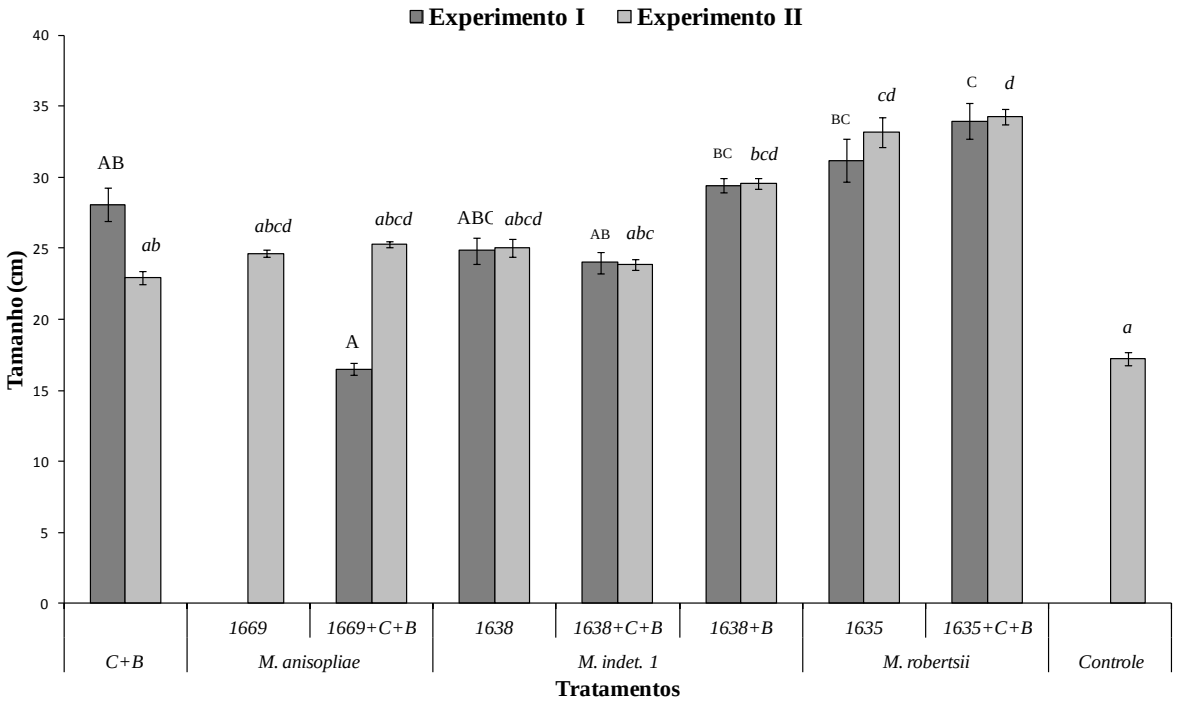

Figura 14 – Comprimento da parte aérea de mudas de cana tratadas com *Metarhizium* spp. e produtos químicos após 25 dias– Experimento I e II. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. *C*: Comet® e *B*: Biozyme TF. Barras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas e minúsculas não diferem pelo teste de Tukey a 5%

Na avaliação 75 dias após o plantio foi possível observar que tanto no primeiro como no segundo experimento não houve diferença estatística entre a maioria das comparações entre os isolados (Figura 15). No primeiro experimento apenas o tratamento com ESALQ1635 e no segundo experimento o tratamento com ESALQ1638 +B foram superiores aos controles.

Isso pode indicar que ao longo do desenvolvimento as mudas tendem a atingir o mesmo tamanho em altura, visto que estes parâmetros são mais ligados a variedade da cana-de-açúcar. Provavelmente o benefício da inoculação de *Metarhizium* para esse parâmetro esteja mais fortemente relacionado com a aceleração da germinação, desenvolvimento e crescimento das mudas.

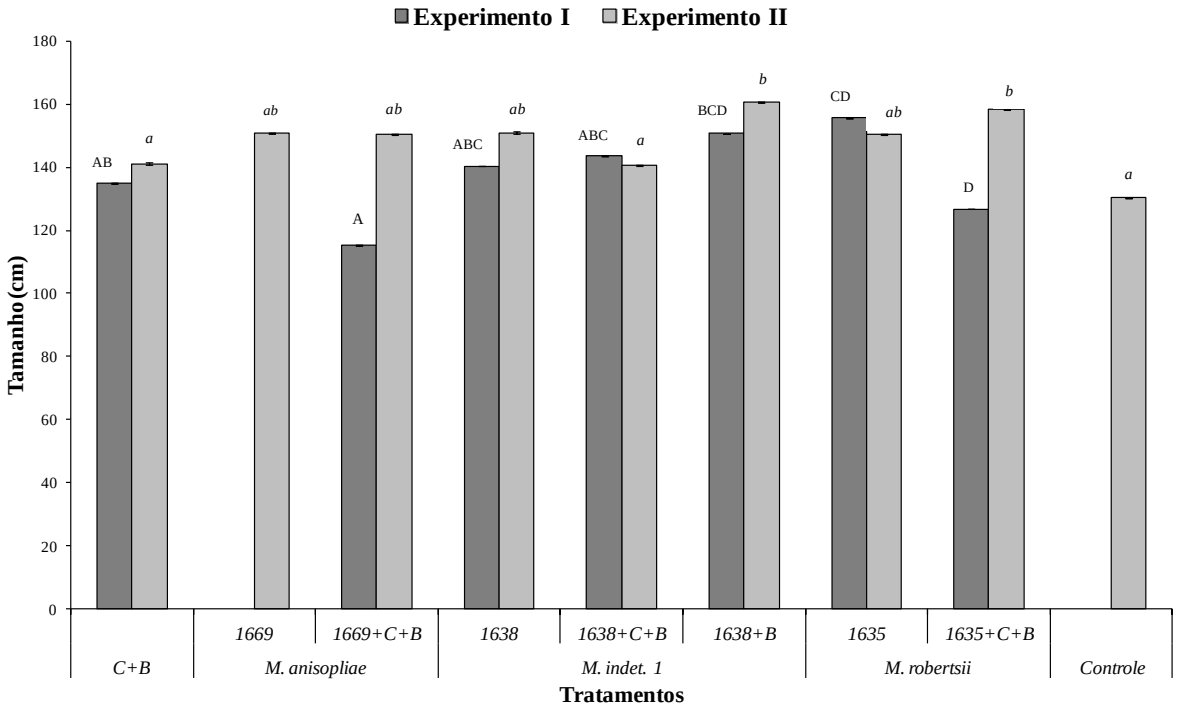

Figura 15 – Comprimento da parte aérea de mudas de cana tratadas com *Metarhizium* spp. e produtos químicos após 75 dias– Experimento I e II. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. *C*: Comet® e *B*: Biozyme TF. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula e pela mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey a 5%

Em relação à colonização das raízes das mudas pelo fungo, foi observado que no experimento I, a porcentagem de recuperação do fungo foi de 33 a 67% aos 25 dias, atingindo de 67 à 100% de colonização aos 75 dias após o tratamento (Figura 16). No experimento II, essas porcentagens variaram entre 33 e 67%, não havendo colonização total de amostras para nenhum tratamento (Figuras 17 e 18).

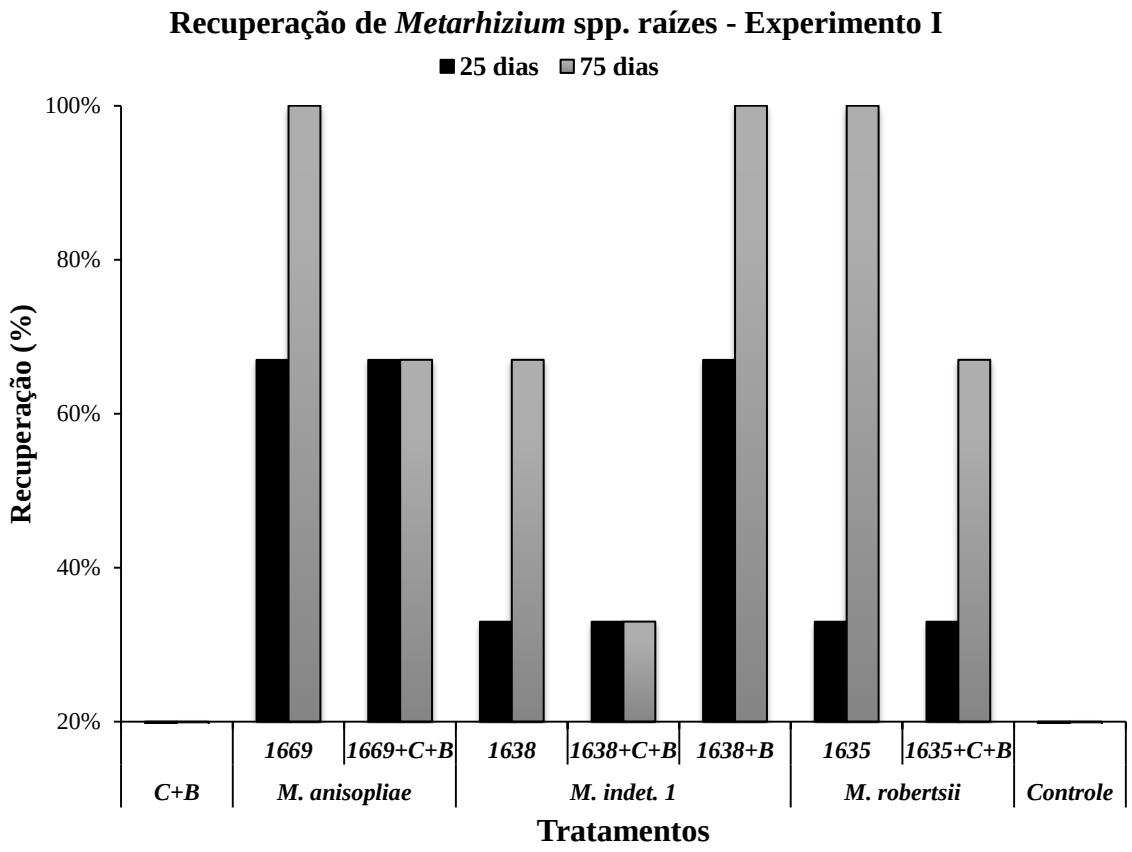

Figura 16 – Porcentagem de recuperação de *Metarhizium* spp. das raízes de mudas de cana-de-açúcar inoculadas com o fungo e produtos químicos após 25 e 75 dias – Experimento I. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. *C*: Comet® e *B*: Biozyme TF

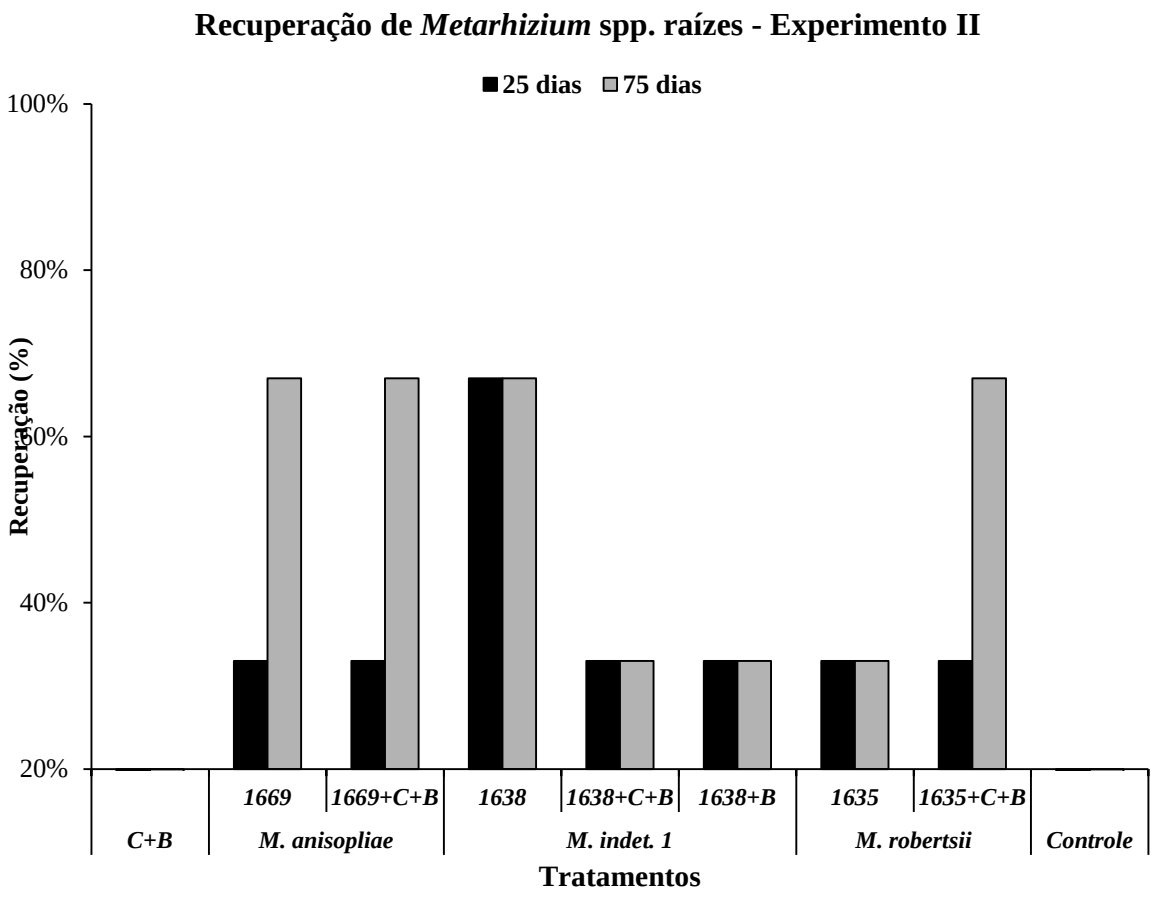

Figura 17 – Porcentagem de recuperação de *Metarhizium* spp. das raízes de mudas de cana-de-açúcar inoculadas com o fungo e produtos químicos após 25 e 75 dias – Experimento II. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. *C*: Comet® e *B*: Biozyme TF

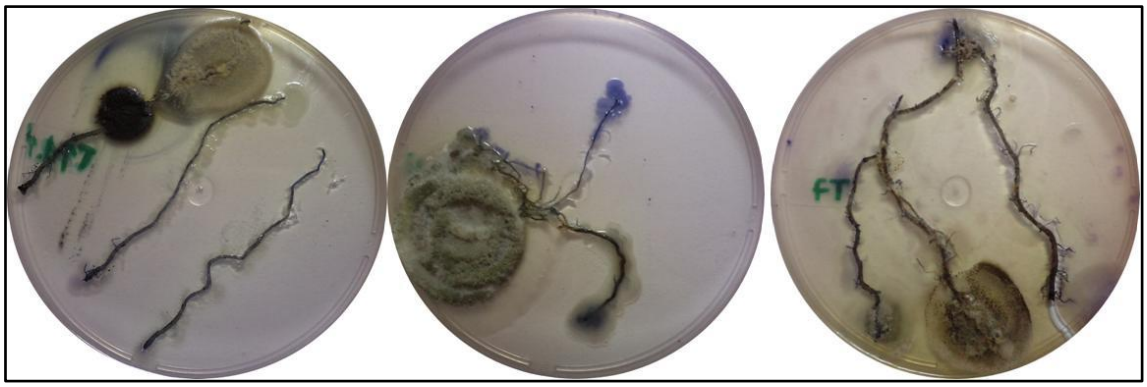

Figura 18 – Aspecto das colônias de *Metarhizium* sp.isoladas das raízes de cana-de-açúcar Var. Sp80-3280 após inoculação com o fungo

Vale ressaltar que mesmo nos tratamentos em conjunto com os produtos químicos Comet® e Biozyme TF, foi possível a recuperação de colônias de *Metarhizium* spp. demonstrando que tais produtos foram seletivos para o fungo. Outra informação adicional foi a recuperação de colônias de *Beauveria* sp. das folhas e caules das mudas, corroborando com o ocorrido nos testes em casa de vegetação.

4.2.4 Plantio das mudas de cana-de-açúcar dos tubetes no campo

O número de perfilho de cada muda reflete a população final de colmos que será estabelecida pela planta, sendo assim, o perfilhamento é importante na formação dos colmos da cana-de-açúcar e seu número pode estar relacionado ao fator da produtividade. Após o plantio das mudas do experimento I em campo, foi avaliado o perfilhamento das mesmas aos 30, 60 e 90 dias. O resultado da avaliação mostra que aos 30 dias, o tratamento ESALQ1638 (*Metarhizium* sp. indet. 1) foi estatisticamente menor em relação ao número de perfilho dos demais (Figura 19).

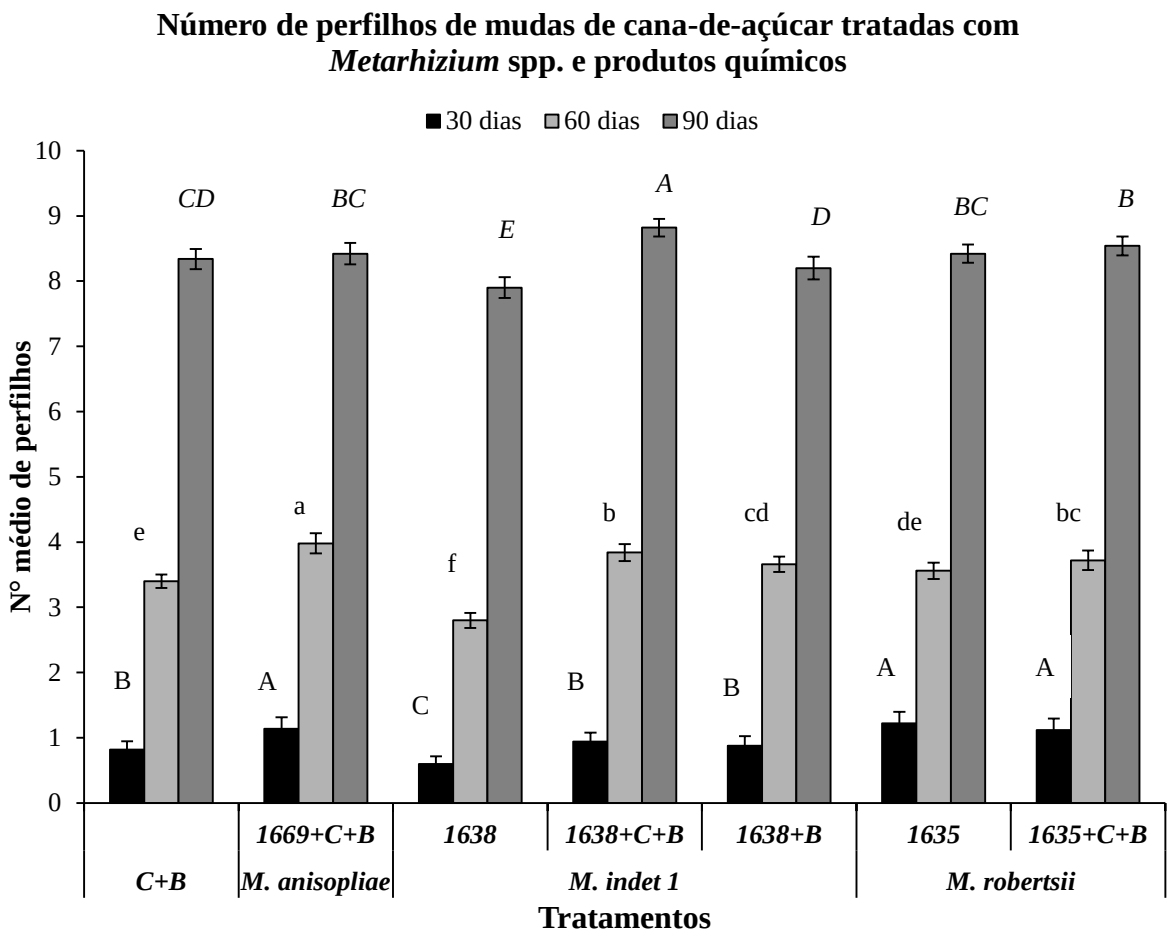

Figura 19 – Perfilhamento de mudas tratadas com *Metarhizium* spp. e produtos químicos ao longo de 90 dias. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. *C*: Comet® e *B*: Biozyme TF. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula, pela mesma letra minúscula e mesma letra maiúscula em itálico não diferem pelo teste de Tukey a 5%

Aos 60 dias após o plantio, os tratamentos ESALQ1669 + CB (*M. anisopliae*) e ESALQ1638 + CB (*Metarhizium* sp. indet. 1) foram significativamente maiores (maior número de perfilhos) que os demais, sendo que na última avaliação, aos 90 dias, o ESALQ ESALQ1638 + CB (*Metarhizium* sp. indet. 1) foi estatisticamente maior que todos os outros tratamentos.

Como conclusão pode-se notar que inicialmente as diferença entre os tratamentos para o número de perfilhos são menores nas mudas e que estas diferenças começam a se tornar maiores após 2 a 3 meses do plantio.

4.3 Bioensaios de patogenicidade e repelência de plantas inoculadas com *Metarhizium* spp. a insetos praga e nematóide da cultura da cana-de-açúcar

4.3.1 Bioensaio com *D. saccharalis*

Os bioensaios realizados com *D. saccharalis* revelaram que as mortalidades totais de lagartas em todos os tratamentos foram superiores a mortalidade do controle, exceto para o isolado ESALQ43, proveniente de inseto. Todas as espécies testadas foram patogênicas para as lagartas de 3° ínstar da broca-da-cana (*M. anisopliae*, *M. robertsii*, *Metarhizium* sp. indet. 1 e 4). Os resultados mostram que 81,8% dos tratamentos de *Metarhizium* spp. testados apresentaram mortalidade confirmada pelo fungo. A mortalidade confirmada pelo fungo variou bastante entre os isolados. As mortalidades confirmadas dos tratamentos com isolados de *M. anisopliae* ESALQ43 (*M. anisopliae* – inseto), ESALQ1604(*M. anisopliae* – produto comercial Biotech®), foram inferiores as mortalidades de todos os outros tratamentos(Figura 20).

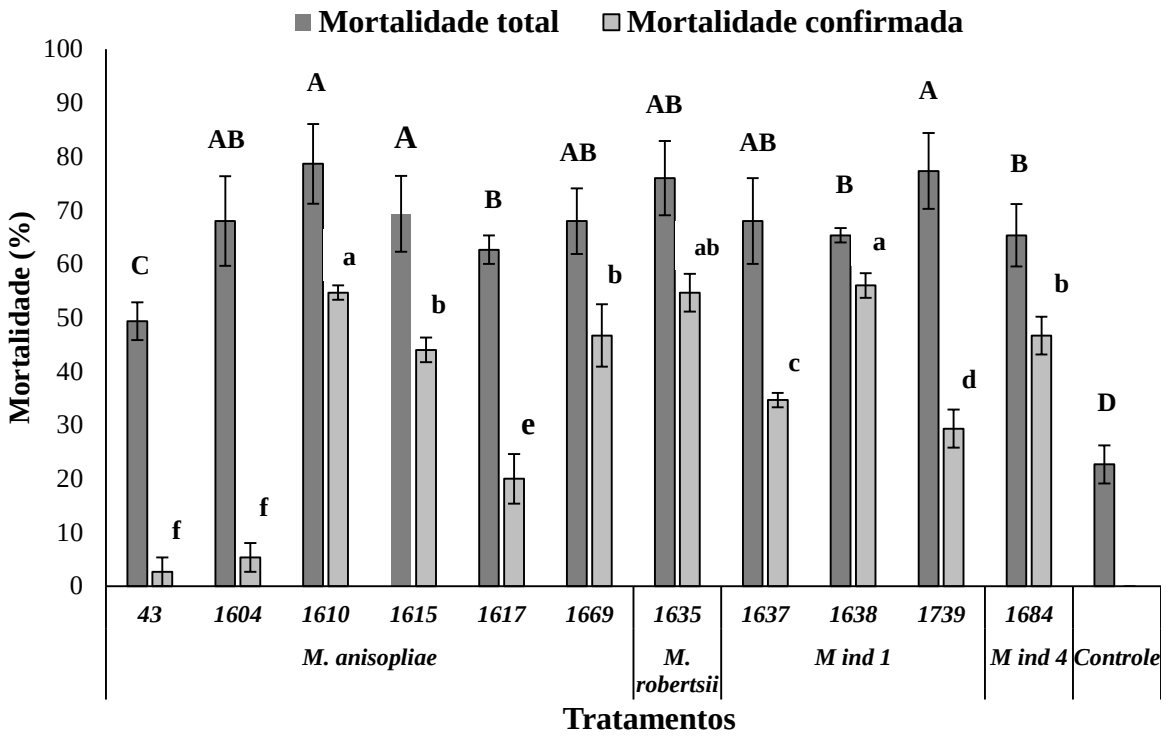

Figura 20 – Mortalidade total e confirmada (%) de lagartas de *Diatraea saccharalis* quando confinadas em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Metarhizium* spp. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula e pela mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey a 5%

As lagartas que se desenvolveram em plantas inoculadas com os diferentes isolados e espécies de *Metarhizium* apresentaram peso menor do que as lagartas do tratamento controle de plantas não inoculadas. Não observou-se diferença no peso entre os tratamentos com fungo (Figura 21).

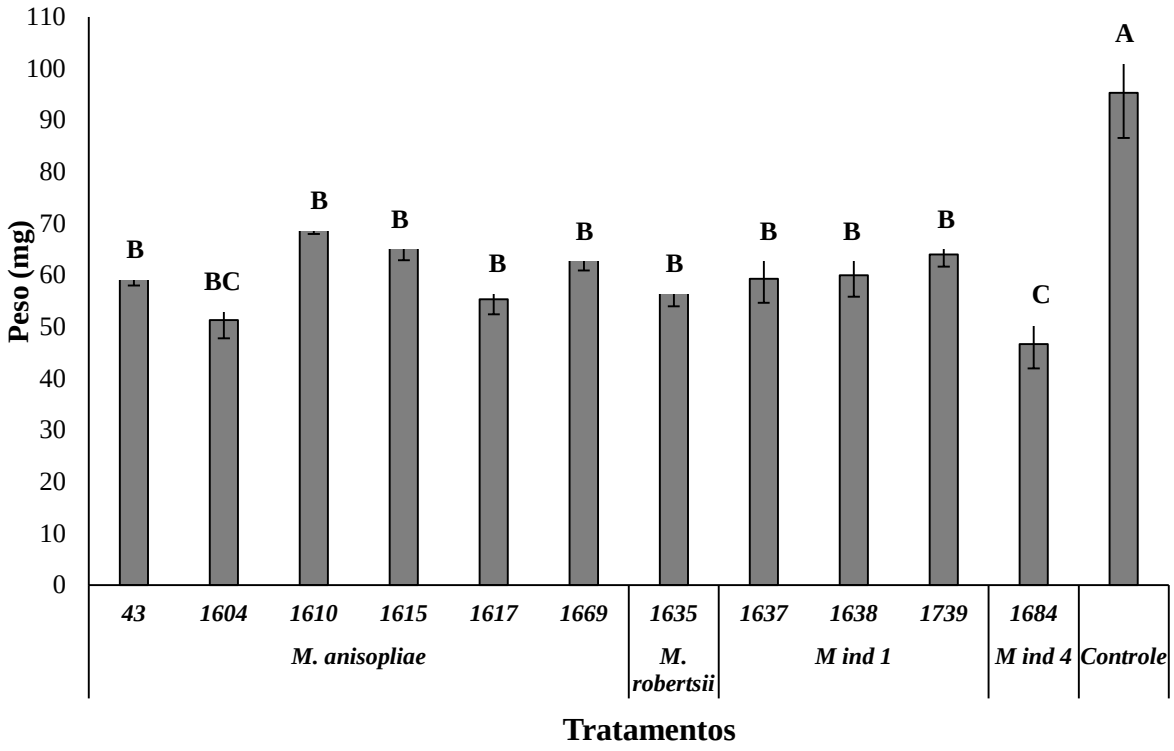

Figura 21 – Peso final (mg) de lagartas de *D. saccharalis* após 20 dias em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Metarhizium* spp. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey a 5%

4.3.2 Bioensaio com *M. javanica*

Os dois ensaios com *M. javanica*, mostraram que a inoculação de *Metarhizium* em plantas de cana-de-açúcar, pode conferir uma proteção para as mesmas por afetar o desenvolvimento dos nematóides. O número de massa de ovos por grama de raiz nas mudas inoculadas com o fungo, após 30 dias da liberação de ovos no solo foi até 59,8% menor no primeiro experimento e 64,1% menor no segundo em relação as mudas sem inoculação. Todos os tratamentos diferiram entre si, (Figura 22). De acordo com os dados também é possível dizer que a melhor espécie para o manejo deste nematóide é *M. anisopliae*, corroborando com os achados de Rossi et al. (2006a, 2006b).

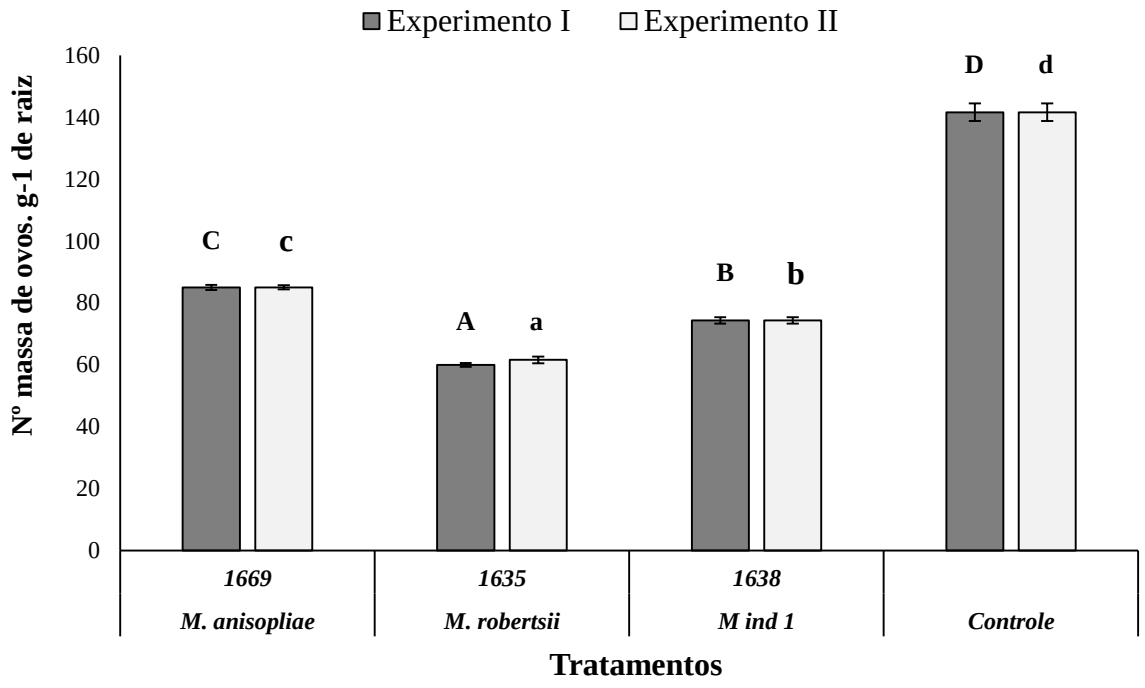

Figura 22 – Número de massa de ovos de *M. javanica* por grama de raiz após inoculação de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. em plantas de cana-de-açúcar. Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula e pela mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey a 5%

4.4 Experimentos de antagonismo de *Metarhizium* spp. aos fitopatógenos *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*

4.4.1 Avaliação do antagonismo "in vitro": cultivo pareado

Os experimentos de antagonismo pelo método de cultivo pareado mostraram que todos os isolados de *Metarhizium* sp. apresentaram alguma forma de antagonismo contra os fitopatógenos *F. moniliforme* e *C. falcatum*. De acordo com as categorias da tabela de avaliação, adaptada de Bell (1982), para o antagonismo a *F. moniliforme*, 60% dos isolados de *Metarhizium* spp. se enquadraram na categoria "C", ou seja, há a formação do halo de inibição e esse se mantém por todo o período de incubação.

Outros 36% dos isolados são pertencentes à categoria "B", ou seja, o fungo fitopatogênico cresce até o limite da colônia de *Metarhizium*, mas não por cima desta. Em relação ao fungo *T. harzianum*, o mesmo foi o único fungo a se enquadrar na categoria "E", que representa o controle total do fitopatógeno, crescendo por cima deste.

O mesmo resultado pode ser observado para o antagonismo ao fungo *C. falcatum*. Todos os isolados de *Metarhizium* apresentaram alguma forma de antagonismo, sendo que 52% dos isolados se enquadram na categoria "C" (há a formação do halo de inibição), 44% na

categoria “B” (o fitopatógeno cresce apenas até o limite da colônia de *Metarhizium*) e o isolado de *T. harzianum* na categoria “E” (total controle do fungo fitopatogênico) (Figuras 23 e 24).

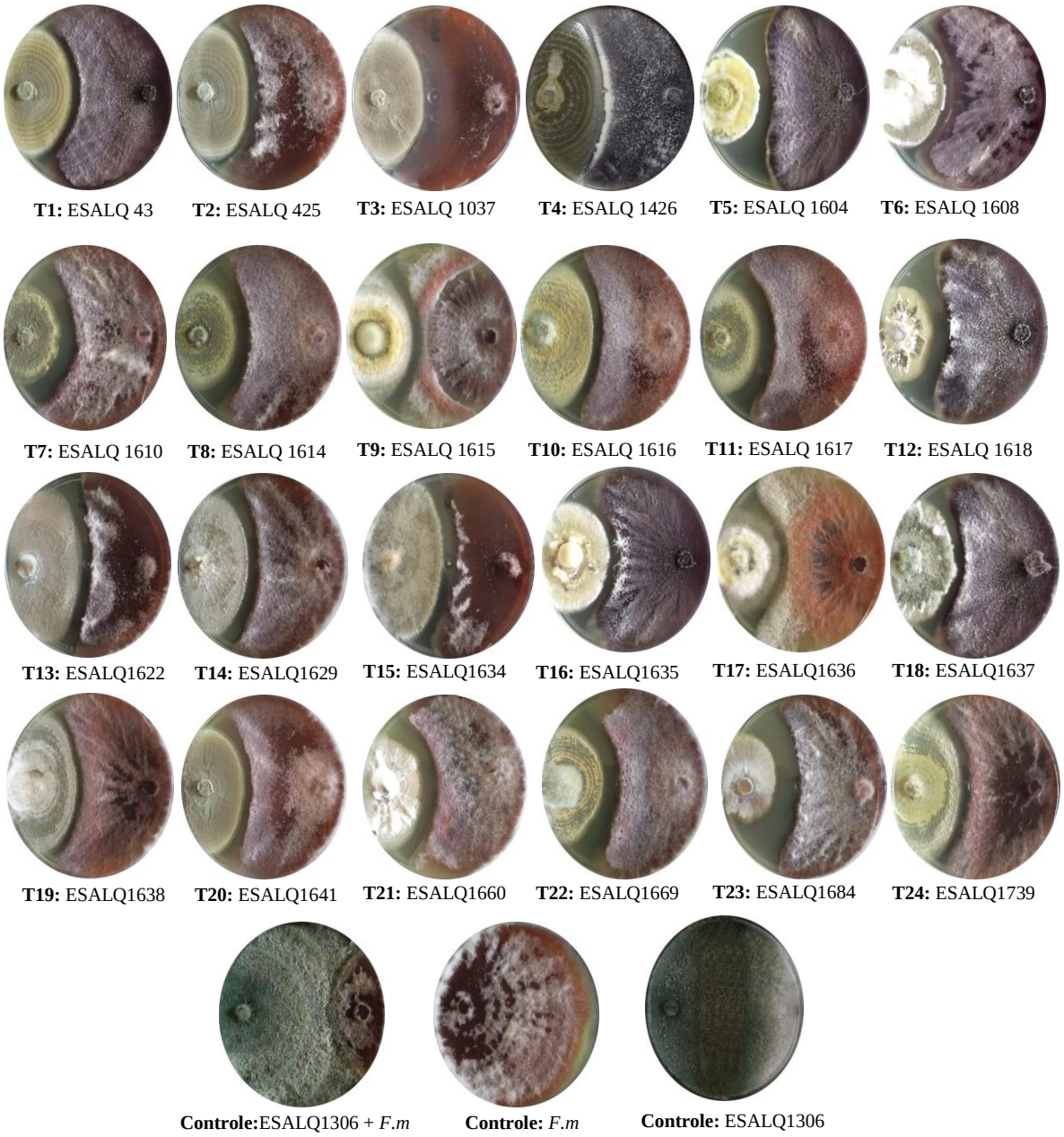

Figura 23 – Antagonismo de 24 isolados de *Metarhizium* spp. ao fitopatógeno *F. moniliforme*. Os números correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP

Figura 24 – Antagonismo de 24 isolados de *Metarhizium* spp. ao fitopatógeno *C. falcatum*. Os números correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

Para ambos os experimentos foram medidos os diâmetros das colônias em cada tratamento, tanto para *C. falcatum* como para *F. moniliforme*, aos 5, 7 e 10 dias, sendo que o diâmetro final (10 dias) foi utilizado para o cálculo da fórmula de porcentagem de inibição, de acordo com Sasan e Bidochka (2013). Como resultados foi possível observar que para o fitopatógeno *F. moniliforme* a porcentagem de inibição por *Metarhizium* alcançou o maior valor para o isolado ESALQ1635 (*M. robertsii* de solo) com 54% de inibição, seguido dos isolados ESALQ1622 (*M. robertsii* de solo) com 53%, ESALQ1615 (*M. anisopliae* – solo)

com 53%, ESALQ1739 (*Metarhizium sp. indet 1* de rizosfera) com 51% e ESALQ1684 (*Metarhizium sp. indet 4* – rizosfera) com 51% (Figura 25). Para o fitopatógeno *C. falcatum*, um maior número de isolados alcançou porcentagens de inibição superiores a 50% e as espécies não foram todas as mesmas que do antagonismo a *F. moniliforme*. As maiores porcentagens de inibição foram para os isolados ESALQ1635 (*M. robertsii* – solo) e ESALQ1634 (*M. robertsii* – solo) ambos com 54%, seguidos dos isolados ESALQ1426 (*M. robertsii* – solo), ESALQ1622 (*M. robertsii* – solo), ESALQ1629 (*M. robertsii* – solo) e ESALQ1616 (*M. anisopliae* – solo) todos com 53% de inibição e por fim o isolado ESALQ1615 (*M. anisopliae* – solo). Apesar disso, não houve diferenças estatísticas nem entre os isolados testados, nem em relação ao fitopatógeno, mostrando que de fato todos os isolados de *Metarhizium* apresentaram alguma forma de inibição aos fitopatógenos testados (Figura 25).

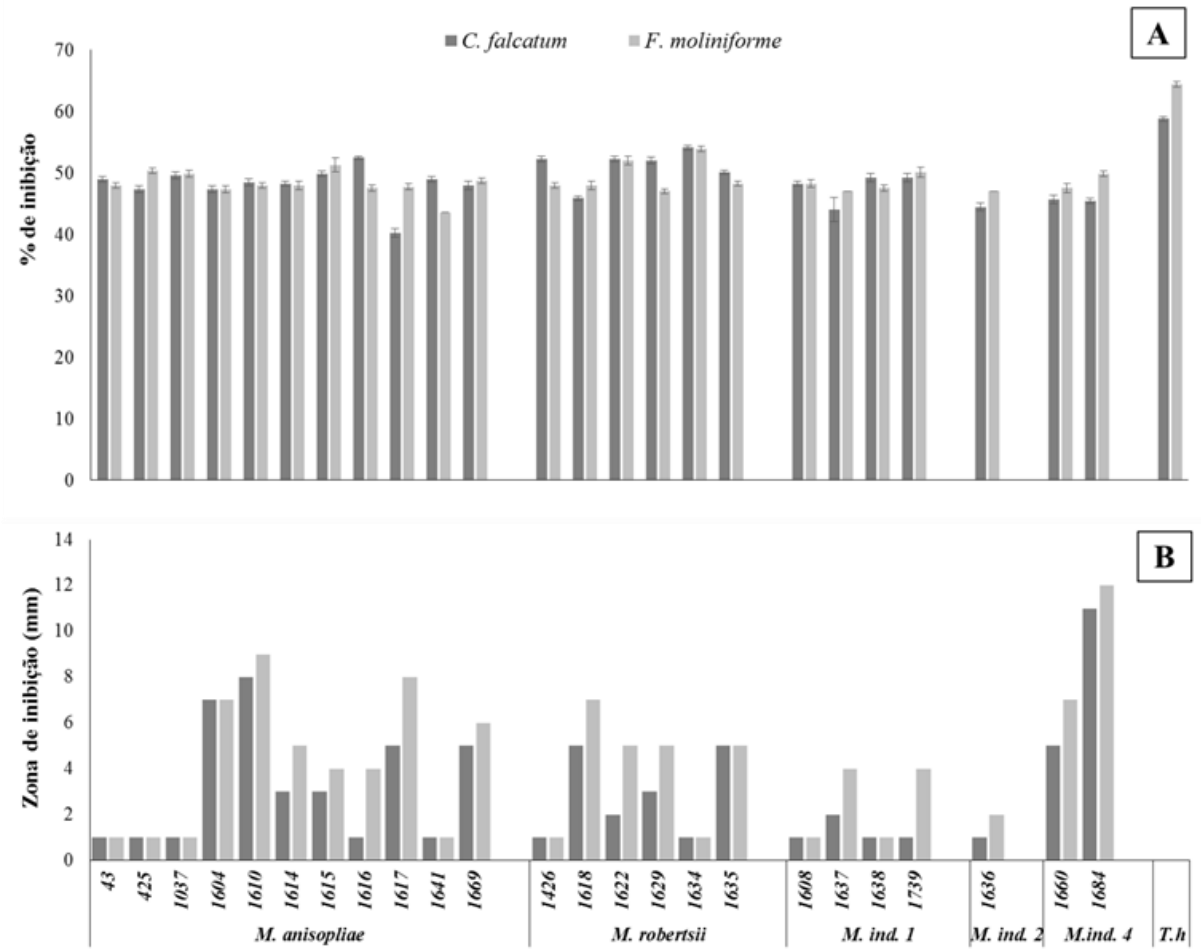

Figura 25 – Porcentagem e zona (mm) de inibição formado no antagonismo de isolados de *Metarhizium* spp. aos fitopatógeno *F. moniliforme* e *C. falcatum*. Fórmula para cálculo: % de Inibição= [(C-T)/C]x100 (SASAN; BIDOCHKA, 2013). Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

Além do cálculo da porcentagem de inibição de cada isolado, também foi mensurado o tamanho do halo de inibição para todos os isolados testados com o auxílio de uma régua. O resultado mostrou que para o fitopatógeno *F. moniliforme*, os isolados que apresentaram maior halo ou zona de inibição foram o ESALQ1684 (*Metarhizium* sp. indet 4 – solo), ESALQ1660 (*Metarhizium* sp. indet 4 – solo), ESALQ1618 (*M. robertsii* – solo), ESALQ1617 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1610 (*M. anisopliae* – solo) e ESALQ1604 (*M. anisopliae* – Biotech) (Figura 25). Para o fitopatógeno *C. falcatum*, os isolados com formação dos maiores halos ou zonas de inibição foram praticamente os mesmos descritos para *F.moniliforme*, ESALQ1684 (*Metarhizium* sp. indet 4 – solo), ESALQ1660 (*Metarhizium* sp. indet 4 – solo), ESALQ1618 (*M. robertsii*– solo), ESALQ1635 (*M. robertsii* – solo), ESALQ1617 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1610 (*M. anisopliae* – solo) e o ESALQ1604 (*M. anisopliae* – Biotech).

4.4.2 Avaliação do antagonismo por voláteis

O antagonismo de *Metarhizium* aos fitopatógenos *F. moniliforme* e *C. falcatum* também foi avaliado quanto à possibilidade de *Metarhizium* estar produzindo algum tipo de composto volátil com função de inibir outros microrganismos.

Para tanto, foram utilizados apenas os isolados selecionados como os melhores antagonistas, de acordo com as avaliações de porcentagem de inibição e tamanho do halo de inibição formado.

Os resultados mostraram que muito provavelmente não haja a presença de compostos voláteis com função de inibição dos fitopatógenos, visto que a presença da cultura de *Metarhizium* no lado oposto dos mesmos, não causou nenhum tipo de alteração para *F. moniliforme* e *C. falcatum*, ou seja, as colônias dos fitopatógenos se desenvolveram naturalmente na outra extremidade da placa, sem que seu tamanho fosse afetado (Figuras 26 e 27).

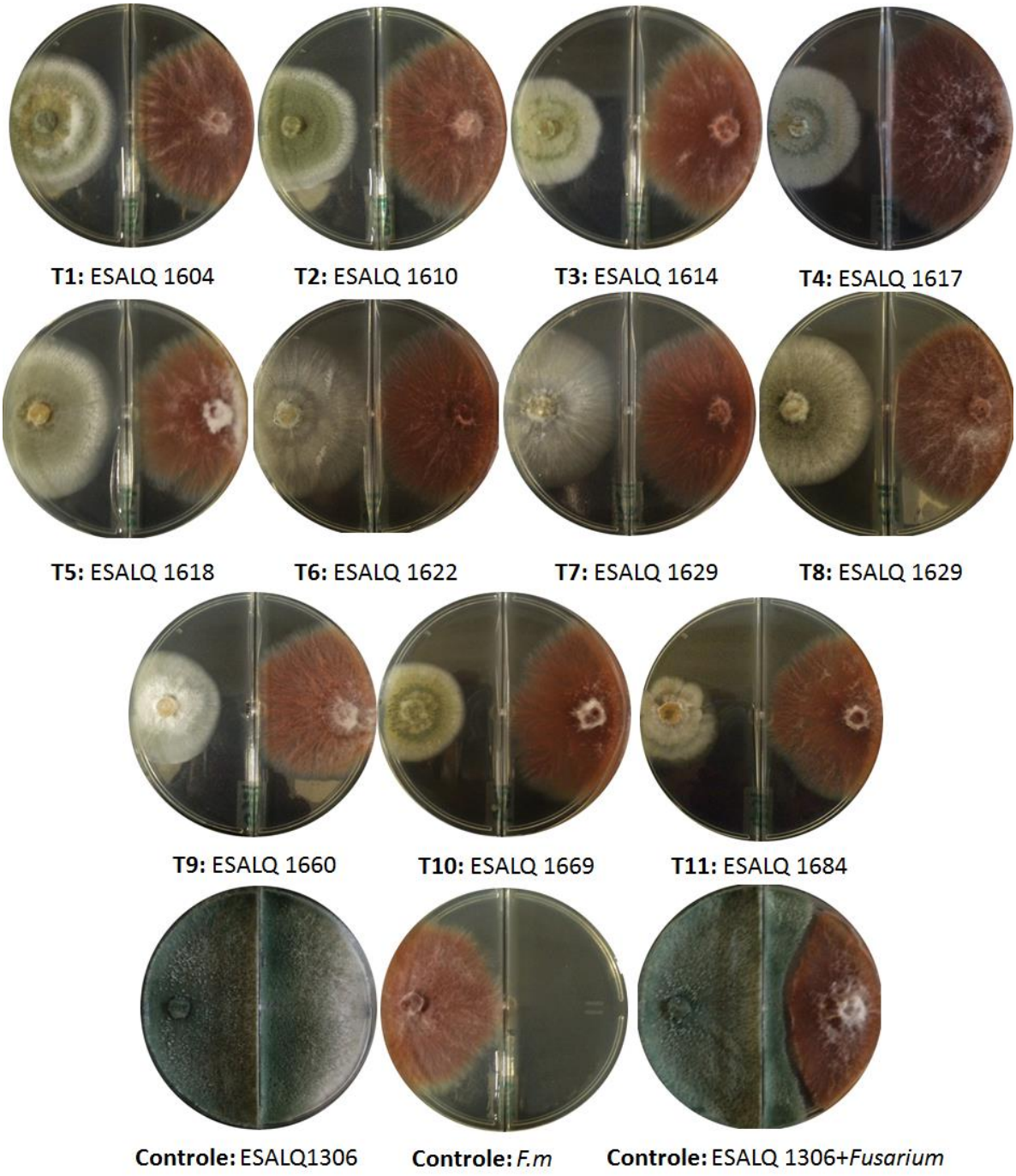

Figura 26 – Resultado do teste de produção de voláteis por *Metarhizium* spp. contra o fitopatógeno *F. moniliforme*. Os números correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

Figura 27 – Resultado do teste de produção de voláteis por *Metarhizium* spp. contra o fitopatógeno *C. falcatum*. Os números correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

4.4.3 Avaliação do antagonismo em meio liquido

Além dos testes de antagonismo em placas de Petri, também foram realizados testes em meio líquido para tentar observar se há a produção de algum composto não volátil (enzimas ou outros) que atuem na inibição dos fitopatógenos. Os resultados mostraram que alguns isolados de *Metarhizium* spp. foram capazes de inibir o crescimento dos fitopatógenos em meio líquido.

Para ambos fitopatógenos (*F. moniliforme* e *C. falcatum*) os resultados qualitativos (observação dos frascos) mostrou que alguns dos isolados testados foram capazes de inibir o crescimento das células do fitopatógeno.

Para a confirmação dos resultados obtidos foram feitas lâminas frescas das culturas que apresentaram inibição e dos controles. Foi possível observar que no experimento com *F. moniliforme*, apenas os isolados ESALQ1614 e ESALQ1629 confirmaram a capacidade de inibição ao mesmo, por apresentarem conídios e conidióforos de *Metarhizium* confirmando a inibição (Figura 28).

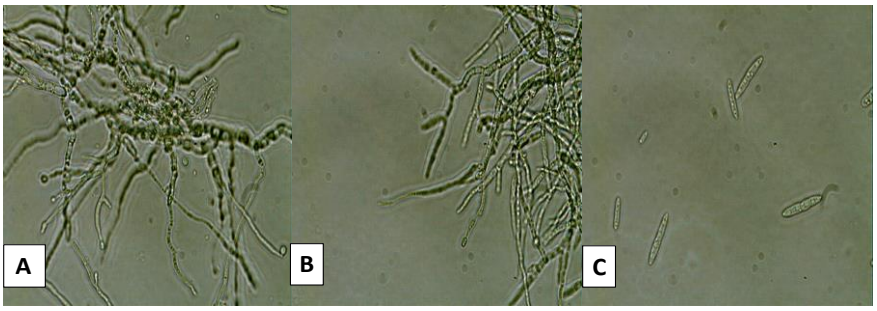

Figura 28 – Teste de antagonismo de *Metarhizium* ao fitopatógeno *F. moniliforme* em meio líquido. A: ESALQ-1614+ *F. moniliforme*; B: ESALQ-1629+ *F. moniliforme* e C: Controle *F. moniliforme*

No experimento com o fitopatógeno *C. falcatum*, não foi possível confirmar a inibição do crescimento do mesmo mediado pela presença de isolados de *Metarhizium* spp. Apenas o tratamento com *T. harzianum* (ESALQ-1306), confirmou sua capacidade de inibição para o isolado por apresentar apenas suas estruturas vegetativas (conídios) nas lâminas (Figura 29).

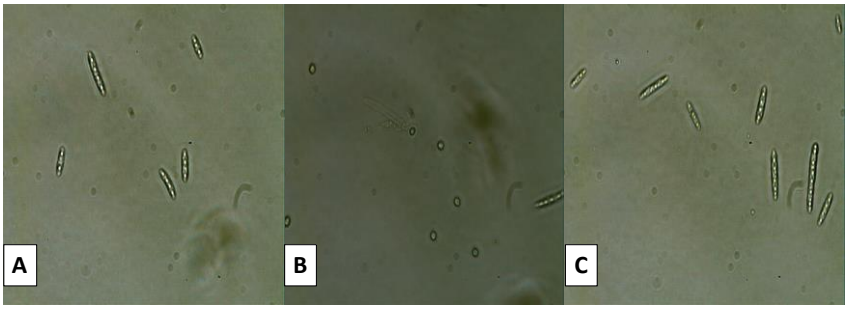

Figura 29 – Teste de antagonismo de *Metarhizium* ao fitopatógeno *C. falcatum* em meio líquido. A: ESALQ-1629+ *C. falcatum* ; B: ESALQ-1306+ *C. falcatum* e C: Controle *C. falcatum*

4.4.4 Experimento de cultivo pareado "in vitro" entre *Metarhizium* spp. e *T. harzianum*

O experimento de cultivo pareado entre *Metarhizium* spp. e *T. harzianum* mostrou que apesar de conviverem naturalmente no solo, *Metarhizium* spp. e *T. harzianum* competem por espaço e nutrientes.

A presença de *T. harzianum* não afetou o diâmetro de *Metarhizium* spp., porém cresceu por cima do mesmo. Além disso, entre suas colônias houve a formação de um halo de inibição nos tratamentos ESALQ425 (*M. anisopliae* – inseto), ESALQ1426 (*M. anisopliae* – inseto), ESALQ1641 (*M. anisopliae* – inseto), ESALQ1610 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1616 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1617 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1629 (*M. robertsii* – solo), ESALQ1634 (*M. robertsii* – solo), ESALQ1635 (*M. robertsii* – solo) e ESALQ1636 (*Metarhizium* sp. indet. 2 – solo) (Figura 30).

A hipótese é que *Metarhizium* spp. possa liberar enzimas que degradem as células de outros fungos, de modo a competir com eles. Mais estudos são necessários para esclarecer a interação entre estes dois importantes grupos de fungos de solo.

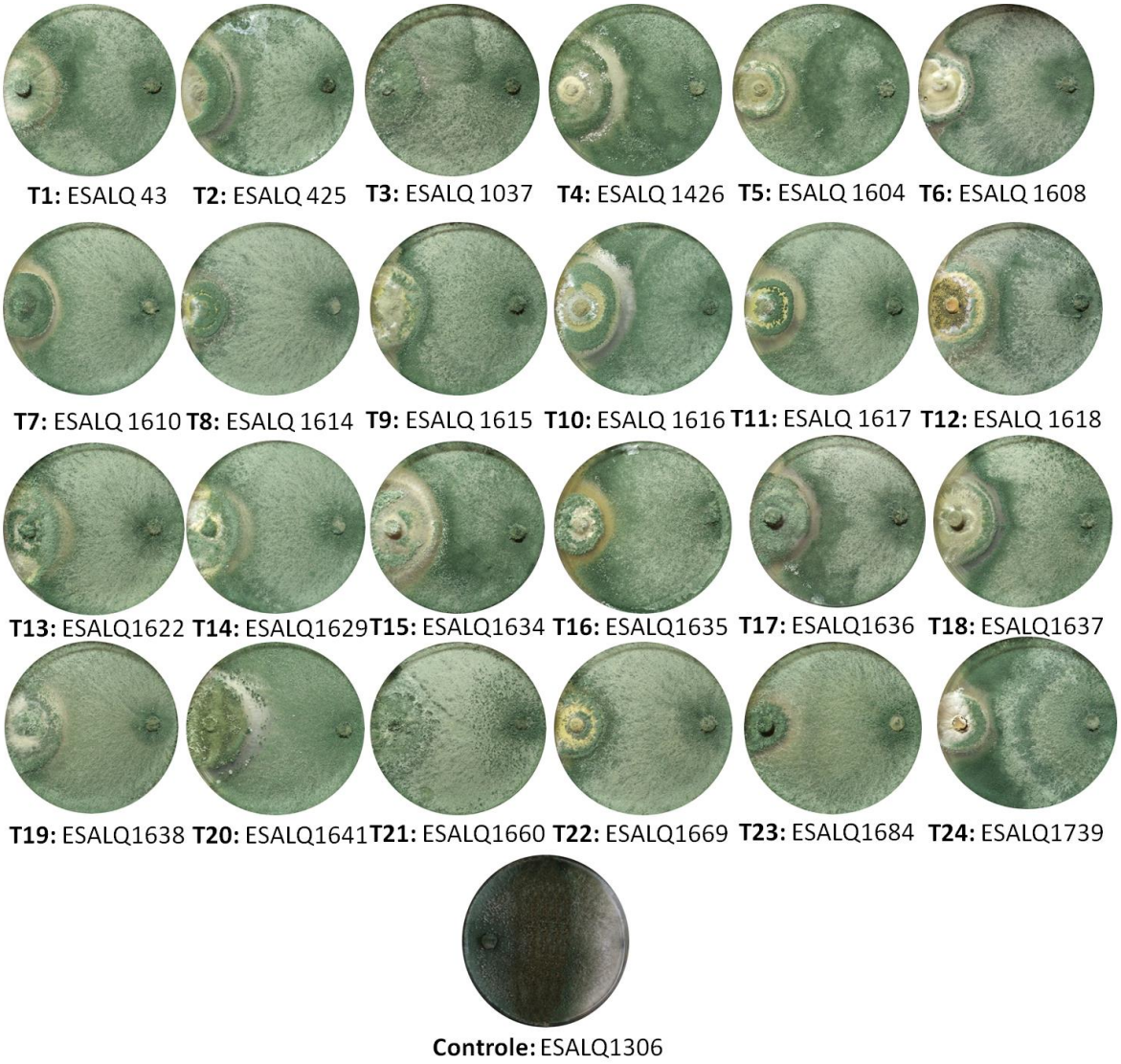

Figura 30 – Teste de antagonismo entre *Metarhizium* spp. e *T. harzianum* por cultivo pareado. Os números correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

Na região do halo de inibição é possível observar as hifas de *Trichoderma* no meio deste espaço, não configurando um halo verdadeiro, mas sim uma possível degradação das hifas por alguma substância produzida por *Metarhizium* (Figura 31).

Figura 31 – Interação entre ESALQ1616 (*M. anisopliae* – solo) e ESALQ1306 (*T. harzianum*). Detalhe para as hifas crescendo entre o halo de inibição

4.5 Ensaios de métodos qualitativos para determinação de características fisiológicas associadas a função de promoção de crescimento e antagonismo de *Metarhizium* spp.

4.5.1 Verificação da capacidade de produção de ß-1,3-Glucanase pelos isolados de *Metarhizium* spp.

Os ensaios de produção de ß-1,3-Glucanase pelos isolados de *Metarhizium* spp. revelaram que 20,8% dos 24 isolados testados são produtores desta enzima hidrolítica (Figura 32). Os isolados produtores da enzima são ESALQ1618 (*M. robertsii* – solo), ESALQ1610 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1684 (*Metarhizium* sp. indet. 4 – solo), ESALQ1660 (*Metarhizium* sp. indet. 4 – solo) e ESALQ1617 (*M. anisopliae* – solo). Todos os outros isolados não produzem a enzima.

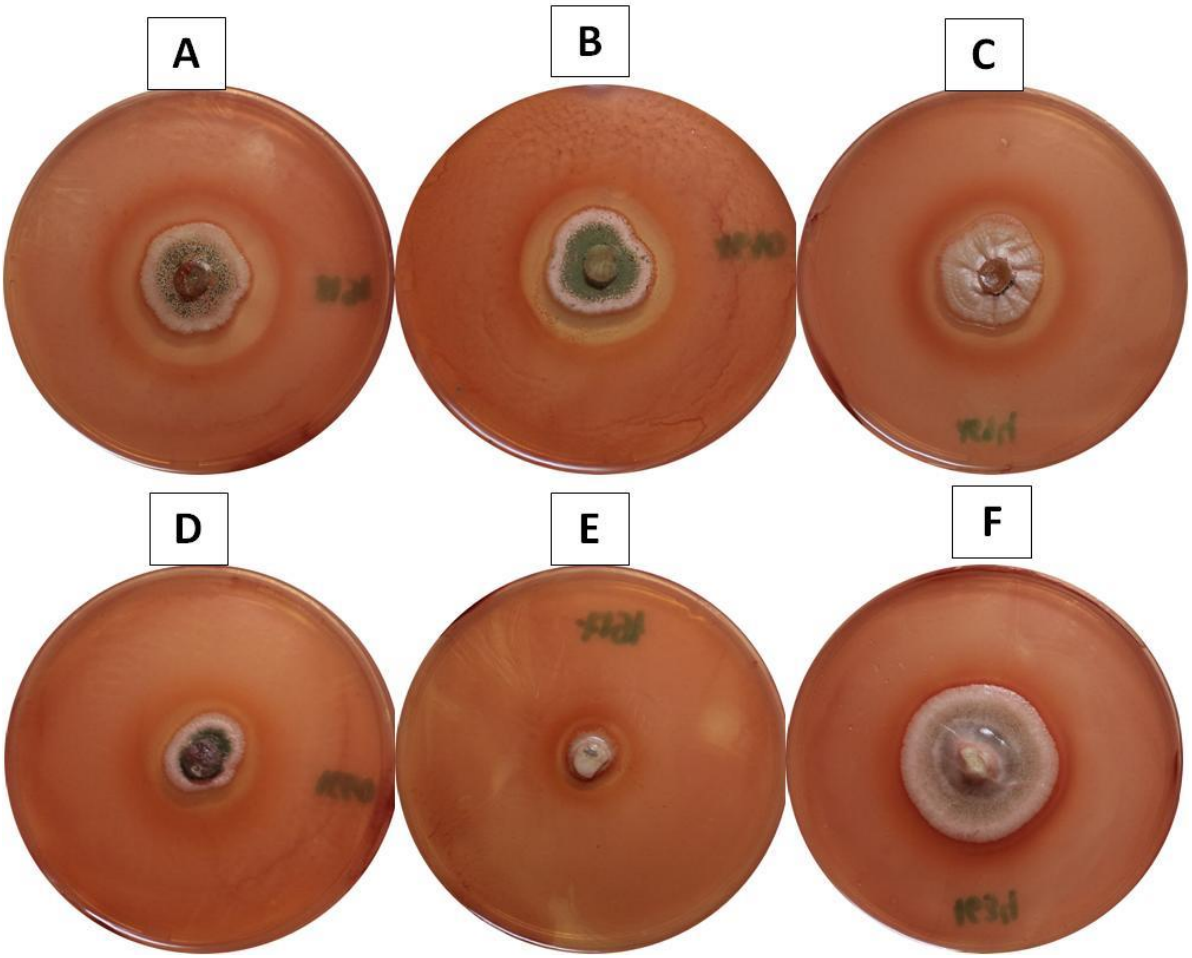

Figura 32 – Produção de ß-1,3-Glucanase pelos isolados de *Metarhizium* spp. Detalhe para halo de degradação; A: ESALQ1618, B: ESALQ1610, C: ESALQ1684, D: ESALQ1660, E: ESALQ1617 e F: ESALQ1634 (isolado não produtor de enzimas hidrolíticas). Os números do eixo x correspondem ao código dos isolados depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

Os resultados deste experimento são importantes para o entendimento dos mecanismos pelos quais *Metarhizium* pode ser antagônico à fungos fitopatogênicos. Para degradar a parede celular dos outros microrganismos, esses fungos produzem a enzima hidrolítica ß-1,3-Glucanase e assim se tornam capazes de atuar no controle biológico destes microrganismos. Vale lembrar que todos estes isolados que produzem a enzima, foram os que formaram zona de inibição nos experimentos de antagonismo por cultivo pareado, sendo então uma possível explicação para tal resultado. Este é possivelmente o primeiro relato da produção deste tipo de enzimas por *Metarhizium*.

4.5.2. Verificação da capacidade de produção de Sideróforos pelos isolados de *Metarhizium* spp.

Os Sideróforos são um dos principais compostos que microrganismos promotores de crescimento vegetal produzem. Desta forma, sua produção ajuda o microrganismo a competir efetivamente contra outros organismos, pelo ferro disponível no ambiente. Além desta, outra função atribuída aos Sideróforos são a solubilização do ferro presente no solo e disponibilização do mesmo para as plantas.

Constatou-se que 8 (33,35%) isolados são produtores de Sideróforos. Os isolados produtores deste composto são ESALQ425 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1604 (*M. anisopliae* – Biotech), ESALQ1615 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1616 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1617 (*M. anisopliae* – solo), ESALQ1618 (*M. robertsii* – solo), ESALQ1684 (*Metarhizium* sp. indet. 4 – solo) e ESALQ-1739 (*Metarhizium* sp. indet. 1 – solo) (Figura 33).

De acordo com a descrição acima é possível perceber que todos os isolados produtores de sideróforos são provenientes de solo e que de todas as espécies de *Metarhizium* testadas, apenas a espécie indeterminada 2 não produziu essa substância.

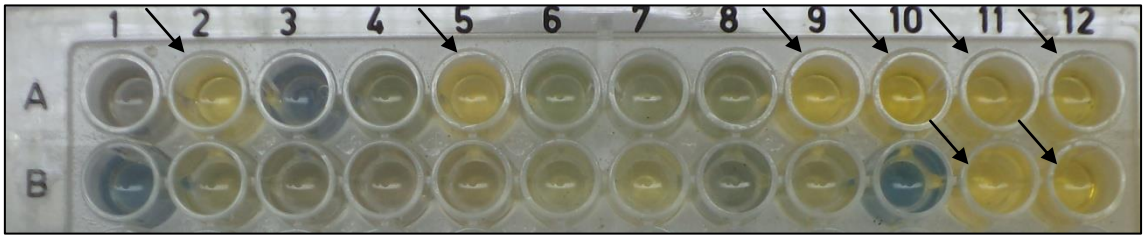

Figura 33 – Resultado dos experimentos de produção de Sideróforos por isolados de *Metarhizium* spp. A coloração amarela indica a produção deste composto pelo fungo. Os isolados produtores de Sideróforos estão apontados por seta preta. De A1-A12: T1 ao T12 e B1-B12: T11-T24 (isolados descritos na tabela 1)

5 DISCUSSÃO

O uso de *Metarhizium* permaneceu por muitos anos focados em sua patogenicidade a insetos, porém estudos recentes, tem se voltado para a exploração da ecologia deste fungo em solos e plantas. Os resultados presentes neste trabalho mostram uma nova área de estudos sobre a relação de fungos entomopatogênicos com plantas.

A relação endofítica de fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* foi recentemente descoberta, mas somente agora esta sendo revelado o potencial do uso aplicado destes benefícios. Azevedo; Araújo (2007) definiram como microrganismos endofíticos todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar prejuízo ao hospedeiro, e que não desenvolvem estruturas externas visíveis. Dentre as vantagens da interação endófito-hospedeiro está o fato do microrganismo se beneficiar com proteção, alimentação e transmissão na planta, enquanto esta se favorece da promoção de crescimento, reprodução e resistência às alterações do ambiente (SAIKKONEN et al., 1998).

Os resultados apresentados neste estudo revelam que diferentes espécies de *Metarhizium* são capazes de colonizar as raízes de mudas de cana-de-açúcar e promover vários benefícios que resultam em crescimento mais rápido das plantas. Trabalhos recentes demonstraram o efeito promotor de crescimento de *Metarhizium* em outras espécies de plantas cultivadas, como feijão (SASAN; BIDOCHKA, 2012), tomate (ELENA et al., 2011), milho (LIAO et al., 2014) e soja (KHAN, 2012), por exemplo, porém este é o primeiro trabalho que mostrou a efetividade deste fungo como promotor de crescimento para a cultura da cana-de-açúcar, utilizando apenas isolados brasileiros. Esse estudo revela especialmente o potencial de espécies de *Metarhizium* ainda não identificadas.

Gemas de cana-de-açúcar tratadas com isolados de *Metarhizium* spp. originaram plantas que apresentaram maior tamanho da parte aérea e maiores valores de peso de raízes comparado aos controles utilizados (água e *T. harzianum*) em condições de casa-de-vegetação. Além disso, foi possível recuperar o fungo inoculado nos experimentos a partir de amostras de raízes das plantas, confirmando que, de fato estes entomopatógenos podem estar fortemente associados a rizosfera de plantas e não necessariamente a parte aérea.

O cultivo da cana a partir de mudas pré-brotadas, permite a redução do volume de gemas ou colmos gastos por hectare, em relação ao plantio convencional, além de outros benefícios como a sanidade das mudas, uniformidade do plantio e menor volume de material no campo (LANDELL et al., 2012). Porém a técnica de plantio por MPB ainda possui limitações pontuais, dentre elas a baixa porcentagem de sobrevivência das mesmas devido a pequena quantidade de reserva da gema (5 cm = 1,2-1,8g de açúcares), comparado ao tolete

(30 cm = 6,0-8,0g de açúcares), sendo necessário ainda investimentos em técnicas que busquem aumentar o número de mudas germinadas e que sejam capazes de sobreviver ao processo de produção das mesmas, que leva em média 60 a 100 dias (FRAGA-JUNIOR, 2015).

Os ensaios de produção de MPB realizados em campo mostram que *Metarhizium* foi capaz de propiciar uma maior germinação e aceleração do desenvolvimento das gemas de cana. O tratamento das gemas com *Metarhizium* spp. isoladamente resultaram em maiores porcentagens de pegamento após o transplantio das mesmas para os tubetes, em relação ao uso do tratamento rotineiramente utilizado pela usina baseado na aplicação de Comet® e Biozyme TF. A brotação das gemas de cana-de-açúcar pode variar de acordo com diversos fatores e deve ser dada atenção redobrada neste período (FRAGA-JUNIOR, 2015).

Estes resultados são importantes do ponto de vista aplicado do uso de *Metarhizium* como probiótico para a cultura da cana-de-açúcar, visto sua ampla e bem-sucedida aplicação para controle de insetos, principalmente da cigarrinha das raízes (*M. fimbriolata*) e sua persistência no solo e colonização das raízes das plantas.

Trabalhos recentes mostraram que *Metarhizium* possui dois ciclos de vida distintos (WANG et al., 2005), um como patógeno de insetos e outro como saprófita. Meyling et al. (2006) e Keyser et al. (2014) indicaram que plantas podem ser utilizadas por *Metarhizium* como um vetor ou hospedeiro, no auxílio da dispersão de seus conídios no ambiente. Corroborando com os resultados obtidos quanto à recuperação dos fungos inoculados a partir de partes da planta, especialmente de tecidos como a raiz.

Metarhizium foi capaz de persistir nas raízes das plantas colonizadas por até 90 dias da inoculação. Neste caso, a porcentagem de recuperação do fungo para alguns isolados chegou até a 100%. Estudos mais antigos de monitoramento sobre populações de *Metarhizium* no solo, já mostravam que o fungo é capaz de se manter melhor na rizosfera do que no solo (HU; ST LEGER, 2002). Um trabalho recente confirma a preferência de *Metarhizium* em habitar a região da rizosfera e raízes das plantas, em comparação ao caule e folhas (BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015), quando isolados por meio de cultura seletivo. Akello e Sikora (2012) também mostraram que *Metarhizium* persistiu por um mês nas raízes de plantas após a inoculação de sementes por imersão em suspensão de conídios. Estes achados confirmam a preferência de *Metarhizium* em habitar as raízes de plantas, assim como sua capacidade endofítica.

Não foi possível a recuperação de colônias de *Metarhizium* das folhas e caules das plantas de cana-de-açúcar inoculadas, diferentemente do encontrado por Batta (2013), que

conseguiu recuperar o fungo *M. anisopliae* de plantas que tiveram suas folhas pulverizadas por uma suspensão do mesmo. Golo et al. (2014) também conseguiu recuperar *Metarhizium* das folhas de plantas inoculadas por *M. acridum* e *M. robertsii* 12 dias após o procedimento.

Apesar disso, vale salientar que colônias de *Beauveria* foram recuperadas de folhas e caules das plantas de cana-de-açúcar, mostrando que este fungo pode ser um endofítico destas plantas. Já é conhecido há algumas décadas, que o gênero *Beauveria* sp. é endofítico em diversas culturas, inclusive em gramíneas, como o milho (*Zea mays* L.) (WAGNER; LEWIS, 2000;) e em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (TEFERA e VIDAL, 2009), porém a ocorrência deste gênero de fungo entomopatogênico endofítico em cana-de-açúcar não havia sido demonstrado.

A clorofila exerce um papel muito importante na quantidade de radiação solar que a planta absorve e que isso está ligado ao potencial fotossintético da planta, o que reflete em sua produção (BARBIERI JUNIOR, 2009). Ainda de acordo com Barbieri Júnior (2009), o teor de clorofila na folha está intimamente ligado às concentrações de nitrogênio destas.

Em nosso experimento não foi possível observar diferenças estatísticas significativas em relação ao teor de clorofila das plantas inoculadas com *Metarhizium* comparando com o controle. Mesmo após 90 dias não foi possível observar se a inoculação com o fungo poderia aumentar os teores de clorofilas A, B e Total nas plantas. Esses resultados são diferentes dos apresentados por Khan (2012) que observou um aumento das taxas de clorofila e do potencial fotossintético de plantas de soja inoculadas com *Metarhizium*. O resultado também sugere que estudos mais específicos e detalhados com numero de amostragens maiores sobre taxa fotossintética e conteúdo de clorofila devam ser realizados para esclarecer os benefícios da inoculação de *Metarhizium* para este parâmetro.

A segunda parte dos experimentos foi conduzida com o objetivo de estudar o antagonismo de isolados de *Metarhizium* spp. contra fungos fitopatógenos da cultura da cana-de-açúcar. Os resultados obtidos mostraram que todas as espécies de *Metarhizium* testadas foram capazes de inibir o crescimento de *F. moniliforme* e *C. falcatum*, sendo que a melhor espécie dentre as testas foi *M. robertsii*, que proporcionou até 54% de inibição para ambos fitopatógenos.

Apenas dois trabalhos foram realizados até o momento com o intuito de observar a capacidade de antagonismo de *Metarhizium* a fitopatógenos e o nosso trabalho se apresenta como o primeiro relato de atividade antagonista para a espécie *M. anisopliae*, visto que os trabalhos publicados relatando antagonismo até agora são apenas em relação as espécies, *M.*

robertsii, *M. brunneum* e *M. flavoviridae* (KEYSER et al. 2015; SASAN e BIDOCHKA, 2013).

Além disso, este também é o primeiro trabalho de teste de antagonismo de *Metarhizium* a importantes fitopatógenos da cultura da cana-de-açúcar. Os resultados obtidos são de grande relevância vista a problemática da podridão vermelha do colmo para a cultura da cana-de-açúcar. Dada a larga utilização de *Metarhizium* nesta cultura, a descoberta do potencial antagônico deste fungo abre mais uma nova utilidade e eficácia da aplicação do mesmo em canaviais e no tratamento de mudas. Além dos experimentos feitos em placa de Petri por cultivo pareado, também foram realizados experimentos que detectaram a produção da enzima hidrolítica ß-1,3-Glucanase, que tem por função degradar a quitina presente na parede de fungos, atributo de muitos microrganismos antagonistas e com potencial de biocontrole de fitopatógenos. Trabalhos feitos utilizando fungos do gênero *Colletotrichum* e *Fusarium* já mostraram a produção desta enzima por outros organismos (CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2008), porém, ainda não foram estudados, até o momento, os processos pelos quais *Metarhizium* consegue inibir o desenvolvimento de fitopatógenos. Nosso trabalho, porém, demonstra que apesar dos isolados testados serem capazes de produzir ß-1,3-Glucanase, nenhum deles produz compostos voláteis que poderia mediar o efeito antagônico, sugerindo que, de fato, o fungo possa estar produzindo estas e outras enzimas aqui não estudadas, além de competir por espaço e nutrientes.

Além da produção de ß-1,3-Glucanase, também foi constatada a produção de sideróforos para alguns dos isolados testados na pesquisa. Sideróforos são pequenas moléculas que tem como função auxiliar o microrganismo a competir com os outros pelo ferro disponível no ambiente, sendo que, desta forma o microrganismo limita o desenvolvimento de outros por meio de supressão, podendo os sideróforos ser também relacionados com o antagonismo à fitopatógenos e também por auxiliar a planta, solubilizando o ferro presente no solo para a mesma (PRABHU, 1996; WINKELMANN et al. 1991).

Glick et al. (1999) afirmaram que o sequestro de ferro por sideróforos está relacionado tanto à promoção de crescimento pela disponibilização do ferro para as plantas, quanto aos controle biológico de doenças de plantas, pela competição pelo ferro com estes.

Desta forma, este resultado complementa os achados dos experimentos em casa de vegetação e também do antagonismo em placas e esta é a primeira vez em que se fala da produção deste composto por fungos entomopatogênicos.

Por fim, a última parte deste estudo objetivou verificar o efeito da relação planta-fungo-inseto, mostrando que a inoculação de *Metarhizium* nas plantas pode beneficiar a mesma protegendo-a contra o ataque de pragas e nematóides. Para o ensaio com a broca-da-cana, *D. saccharalis*, foi observado que 90% das espécies testadas causaram mortalidade confirmada à praga. Neste experimento o método de inoculação foi aplicação de suspensão diretamente no solo e foi possível notar que mesmo após um período de tempo o fungo ainda estava presente e foi capaz de matar os insetos. Estudos observando a ação endofítica por mais tempo nas plantas serão importantes para confirmar a persistência destes benefícios.

O experimento com o nematóide *M. javanica*, mostrou que a inoculação do fungo propiciou a diminuição no número de massa de ovos nas raízes das plantas de cana-de-açúcar em relação ao controle. Estudos sobre a utilização de *Metarhizium* para o controle de nematóides são poucos e antigos. Rossi et al. (2006a) observou uma diminuição dos níveis populacionais dos nematóides quando *M. anisopliae* foi aplicado no sulco de plantio de cana-de-açúcar (ROSSI et al., 2006a) e em outro trabalho, observou-se que *M. anisopliae* diminuiu significativamente os números de ovos e de juvenis de segundo estádio emergidos (ROSSI et al., 2006b).

Ensaios futuros com utilizando mais isolados do fungo e até mesmo outra espécie de nematóide praga, como *Meloidogyne incognita*, nematóide das galhas da cana-de-açúcar, serão de extrema importância para confirmação do potencial de *Metarhizium* no controle de nematóides, visto que não há trabalhos científicos nesta linha.

Diante do grave problema fitossanitário que os nematóides de galhas representam para o sistema canavieiro, a alternativa da aplicação de *Metarhizium* para esta finalidade se mostra muito promissora pelo fato deste fungo já ser amplamente utilizado na cultura da cana-de-açúcar no Brasil.

Ainda são muito incipientes os trabalhos que estudaram relações entre plantas inoculadas com *Metarhizium* e ação desta interação para insetos praga ou nematóides. Akello e Sikora (2012) observaram que plantas inoculadas com o fungo por tratamento de sementes afetaram o desenvolvimento de afídeos, em relação ao *fitness* e reprodução.

Keyser et al (2014) mostrou que *Metarhizium* pode manter sua patogenicidade a insetos mesmo quando inoculados nas raízes de plantas, demonstrando que a planta pode atuar como ponte entre o entomopatógeno e insetos hospedeiros.

Os mecanismos pelos quais o fungo é capaz de, ora colonizar plantas, ora matar insetos pode ser explicado pela descoberta da existência dos genes MAD1 (*Metarhizium* adhesin 1) ligado à produção de blastosporos e virulência a insetos e o MAD2 (*Metarhizium*

adhesin 2), relacionado colonização e crescimento do fungo em plantas (WANG; ST LEGER 2007; WANG, HU, ST LEGER, 2005). A descoberta destes dois genes, ajuda no entendimento de mecanismos fisiológicos do fungo para se adaptar à diferentes condições através dos níveis de expressão destes genes. De acordo com Keyser et al (2014) a associação do fungo com plantas pode beneficiar o mesmo por aumentar sua mobilidade no solo e a chance de encontrar insetos hospedeiros suscetíveis.

Metarhizium além do seu potencial como agente de biocontrole de pragas, apresenta outros benefícios até então pouco estudados ou desconhecidos. No caso da cultura da cana-de-açúcar, ele pode também promover um melhor arranque da gema inoculada com o fungo, fazendo que o propágulo esteja menos vulnerável a intempéries que possa ocorrer no solo, como pragas e doenças. Além disso, desencadeia um maior crescimento vegetativo, comprimento de planta e número de perfilhos, que culminará em uma maior produtividade. Atrelado a isso temos os benefícios já conhecidos como o controle de pragas como *D. sacharalis*, e também efeitos benéficos pouco conhecidos, sobre seu efeito sobre fitonematóides e fitopatógenos. Os resultados aqui apresentados são inovadores, e abrem portas para explorar os entomopatógenos não somente como biocontroladores de pragas, mas também como possíveis probióticos de plantas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de fungos entomopatogênicos atuando como colonizadores da rizosfera de plantas, como promotores de crescimento e antagonistas a fitopatógenos abre mais possibilidades para a exploração das interações dos mesmos com plantas, principalmente almejando usufruir da capacidade endofítica destes fungos no biocontrole de insetos.

Diante deste cenário surge a necessidade de investimentos em pesquisas que visem compreender os mecanismos de colonização de *Metarhzium* spp. em plantas, a persistência dos mesmos, os benefícios que o fungo poderá oferecer a planta hospedeira e principalmente entender a relação fungo-planta-inseto, buscando esclarecer a capacidade de interações como esta aplicadas ao controle biológico de insetos praga.

Nossos resultados se mostraram relevantes do ponto de vista da importância da cultura da cana-de-açúcar para o Brasil e pelo fato de *Metarhizium anisopliae* ser aplicado e produzido em larga escala em usinas de todo o país. Estes resultados indicam que o isolado ESALQ1635 é foi o melhor dentre os outros para todos os parâmetros testados, entretanto as linhagens brasileiras ainda não identificadas também são muito promissoras.

Estudos futuros serão necessários para compreensão dos mecanismos que o fungo utiliza para conferir os benefícios de crescimento, assim como o antagonismo a fitopatógenos. Ensaios em campo, com diferentes variedades de cana-de-açúcar e diferentes concentrações do fungo serão necessários para o planejamento e implementação de uma nova técnica de produção de mudas com o uso de *Metarhizium* spp. e até mesmo a aplicação em campo visando alcançar os benefícios aqui mostrados.

REFERÊNCIAS

ABAWI, G.S.; CHEN, J. Concomitant pathogen and pest interactions. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAN, G.L. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p. 135-158.

AKELLO, J.; SIKORA, R. Systemic acropedal influence of endophyte seed treatment on *Acyrthosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive finesse. **Biological Control,** Orlando, v. 61, p. 215-221, 2012.

ALFONSI, R.R.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; BRUNINI, O.; BARBIERI, V. Condições climáticas para a cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. (Ed.). **Cana-de-açúcar:** cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 1, p. 42-55. 1987.

ALVES, S.B. (ed.). 1998. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Fealq, Piracicaba.1163 p.

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. **Controle microbiano de pragas na América Latina.** Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 69-110.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bactéria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, p. 173-181, 2008.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A. O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **Fungi:** multifaceted microbes. New Delhi: Anamaya Publ., 2007. p. 189-207.

BARBIERI JUNIOR, E. **Características estruturais, teores de clorofila e suas relações com o nitrogênio foliar e a biomassa em capim – Tifton 85.** 2009. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

BATTA, Y.A. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. **Crop Protection**, Giuldford, v. 44, p. 128-134, 2013.

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, 1553-1560, 2014.

BEHIE, S.W.; JONES, S.J.; BIDOCHKA, M.J. Plant tissue localization of the endophytic pathogenic fungi *Metarhizium* na *Beauveria*. **Fungal Ecology**, London, 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**, Washington, v. 336, p. 1576-1577, 2012.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAN, C.R. In vitro antagonism of Trichoderma species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 72, p. 379-382, 1982.

BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, Buckinghamshire, v. 22, p. 280-283, 2011.

BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; DE CROSS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathotenic fungus *Metarhizium anisopliae:* Uncovering cryptic species? **Applied an Environmental microbiology**, Washington, v.67, 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, p. 1198–1204, 1998.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the Metarhizium anisopliae lineage. **Mycologia**, New York ,v.101, p.512-530, 2009.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis.* In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORREA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 409-425.

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

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

CHANCHAICHAOVIVAT, A.; BHINYO, P.; RUENWONGSA, P. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. **Biological Control**, Orlando, v. 47, p. 207-215, 2008.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira:** cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2015. Brasília, 2015. 38 p.

COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77 p.

DINARDO-MIRANDA, L.L. PRAGAS. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, G.A. (Eds.). Cana-de-açúcar, Campinas: Instituto Agronômico, cap. 17, p.349-404, 2008.

DINARDO MIRANDA, L.L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 110, 2005. Disponível em: <http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/7759ddc6878ca7eb83256d05004c6dd1/$FILE/Enc25-32-110.pdf>. Acesso em: 15 hun. 2014.

_____. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agronômico, 2008. cap. 17, p.349-404.

DINARDO-MIRANDA, L.L; FERREIRA, J.M.G. Eficiência de inseticidas no controle da cigarrinha das raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae), em cana-de açúcar. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 22, n. 3, p. 35-39, 2004.

ELENA, G.J.; BEATRIZ, P.J.; ALEJANDRO, P.; LECUONA, R.E. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. **Advances in Biological Research,** Deira, v. 5, p. 22-27, 2011.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA. **Manual do medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG CFL 1030.** Porto Alegre, 2008. 4 p.

FANG, W.G.; 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, Nov. 2010.

FRAGA-JÚNIOR, E.F. **Considerações sobre o manejo de irrigação na produtividade e qualidade de gemas de cana-de-açúcar para viveiros de mudas-pré-brotadas**. 2015. 110 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Sistemas Agrícolas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Quiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

FERRARI, F. **Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*., Poaceae).** 2010. 91 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

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

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

GLICK, B. R.; PATTEN, C.L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D.M. Biological control of Sclerotium rolfsii Sacc. in peanut by inoculation with Pseudomonas flurescens. **Soil Biology na Biochemistry**, v. 19, p. 35-38, 1999.

GOLO, P.S.; GARDNER, D.R.; GRILLEY, M.M.; TAKEMOTO, J.Y.; KRASNOFF, S.B.; PIRES, M.S.; FERNANDES, É.K.K.; BOTTENCOURT, RV.R.E.P.; ROBERTS, D.W.

Production of destrixins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonizaed cowpea plants. **Plos One,** San Francisco, v. 9, e104946, 2014.

GREENFIELD, M.; PAREJA, R.; ORTIZ, V.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, M.I.; VEGA, F.E.; PARSA, S. A novel method to scale up fungal endophyte isolations. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 25, n. 10, p. 1208-1212, 2015.

HU, G.; ST LEGER, R. Fiels studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 6383-6387, 2002.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inoculate of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v.57, p. 1025-1028, 1973.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 48, p. 629, 1964.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; SAMIYAPPAN, R. Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (Musa spp.) under Field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 45, p. 71-77, 2010.

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.

KEYSER, C.A.; JENSEN, B.; MEYLING, N.V. Dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea* against an insect and a seed-borne pathogen in wheat. **Pest Management Science,** Sussex, v. 15, n. 249, p. 1-11, 2015. doi: 10.1002/ps.4015

KEYSER, C.A.; THORUP-KRISTENSEN, K.; MEYLING, N.V. *Metarhizium* seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects. **Fungal Ecology,** London, v. 11, p. 122-133, 2014.

KHAN, S. et al. Mass multiplication and shelf life of liquid fermented final product of Trichoderma viride in different formulations. **Adv. Biores**., v. 2, n. June, p. 178–182, 2011.

KHAN, A.L. Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** Oxford, v. 28, p. 1483–1494, 2012.

LANDELL, M.G. de A.; CAMPANA, M.P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M.A.; ANJOS, I.A. dos; DINARDO-MIRANDA, L.L.; SCARPARI, M.S.; GARCIA, J.C.; BIDÓIA, M.A.P.; SILVA, D.N. da; MENDONÇA, J.R. de; KANTHACK, R.A.D.; CAMPOS, M.F. de; BRANCALIÃO, S.R.; PETRI, R.H.; MIGUEL P.E.M. **Sistema de multiplicação de cana-de-acucar com uso de mudas pre-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Ribeirão Preto: Instituto Agronômico de Campinas, 2012. 17p. (IAC. Documentos, 109).

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

LEAL, J.E.T.; GINAK, S.G.; ROSSI, M.M.; MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. Influência da cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (*Hemiptera : Cercopidae*) e seus métodos de controle sobre a produtividade e a qualidade da cana-de-açúcar. **Nucleus**, Ituverava, ed. esp., p. 55-64, 2008.

LIAO, X.; FENG, W.; LIN, L.; LU, H.; ST. LEGER, R.J. *Metarhizium robertsii* produces an extracellular invertase (MrINV) that plays a pivotal role in rhizospheric interactions and root colonization. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 10, p.78118, 2013.

LIAO, X.; O'BRIEN, T.; FANG, W.; ST. LEGER, R. The plant beneficial effects of Metarhizium species correlate with their association with roots. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p. 7089-7096.

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.; 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.

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.

MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; ALMEIDA, L.C.; ARAÚJO, J.R.; MAGRINI, E.A. **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar:** manual de instrução. Piracicaba: IAA; PLANALSUCAR, 1983. 22 p.

MARTINS, N.G.S. **Os fosfatos na cana-de-açúcar.** 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecossystem. **Agriculture, Ecossystem & Environment,** Amsterdam, v. 113, p. 336-341, 2006.

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

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.

NEILANDS, J.B.; LEONG, S.A. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 37, p. 187-208, 1986.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação dos insetos para programas de controle biológico.** Piracicaba: FEALQ, 1999. 37 p.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEJA, F.E. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. **Journal of Visualized Experiments** , Somerville, v. 74, p. 503-560, 2013.

PAVA-RIPOLL, M.C.; ANGELINI, C.; FANG, W.; WANG, S.; POSADA, F.J.; ST.LEGER, R. The rhizosphere competent entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* express a specific subset of genes in plant root exudate. **Microbiology,** London, v. 157, p. 47-55, 2011.

PRABHU, V.; BIOLCHINI, P.F.; BOYER, G.L. Detection and identification of ferricrocin produced by ectendomycorrhizal fungi in the genus *Wilcoxina*. **BioMetals**, Dordrecht, v. 9, p. 229-234, 1996.

PRECETTI, A.; ARRIGONI, E. **Aspectos bioecológicos e controle do besouro Sphenophorus levis Vaurie, 1978 (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar.** São Paulo: COPERSUCAR, 1990. 15 p. (COPERSUCAR. Boletim Técnico. Edição especial).

PRECETTI, A.A.C.M.; TERÁN, F.O.; SÁNCHEZ, A.G. Alterações nas características tecnológicas de algumas variedades de cana-de-açúcar, devidas ao dano da broca *Diatraea saccharalis.* **Boletim Técnico COPERSUCAR,** Piracicaba, v. 41, p. 3-8, 1988.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vitro screening systems for potential biocontrol agents of *Gaemannomyces graminis*. **Plant Pathology**, Sussex, v. 40, p. 524-532, 1991.

REZENDE, J.M. **Diversidade filogenética e expressão de genes de virulência de *Metarhizium* com ênfase em isolados brasileiros associados a cultura da cana-de-açúcar.** 2014. 137 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

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.

ROSSI, C.E.; ALMEIDA, J.E.M.; LIMA, C.B.; RIBEIRO, L.D.; PETRI, J. Efeito de inseticidas fitoquímicos e microbianos em nematóides da cana-de-açúcar. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos,** Piracicaba, v. 24, n. 4, p. 34-36, 2006a.

ROSSI, C.E.; MIRANDA, P.M.A.D.; ALMEIDA, J.E.M.; ZAPPELINI, L.O. Avaliação de fungo entomopatogênico no controle de nematóide de galha em berinjela. In: ENCONTRO ANUAL DE OLERICULTURA, 2006. **Anais…** 2006b.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics,** Palo Alto, v. 29, p. 319-343, 1998.

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

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

SCALA, F.; HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. Parallel formation and synergism of antagonistic action of *Trichoderma hanzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 4364-4370, 1994.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 160, p. 47-56, 1987.

TEFERA, T.; VIDAL, S. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Biological Control,** Orlando, v. 54, p. 663–669, 2009.

WAGNER, B. L.; LEWIS, L. C. Colonization of corn, Zea mays, by the entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana. Applied and Enviromental Microbiology, v.66, p. 3468 - 3473, 2000.

WANG, C.; ST. LEGER, R. The MAD 1 Adhesion of Metarhizium anisopliae links adhesion with blasopore production and virulence to insects and MAD2 Adhesionenables attachement to plants. **Eukaryotic Cell,** Washington, v. 6, p. 808-816, 2007.

WANG, C.; HU, G.; ST. LEGER, R.J. Differenial gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 704-718, 2005.

WINKELMANN, G. Importance of siderophores in fungal growth, sporulation and spore germination. In: HAWKSWORTH, D.L. (Ed.). **Frontiers in mycology**. Madson: CAB International, 1991. p. 49-65.

WYREBEK, M. Three sympatric ally occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. **Microbiology**, Washington, v. 157, p. 2904–2911, 2011.

ZANARDO, A.B.R. **Abundância de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales e diversidade genética de *Metarhizium* spp. isolados de amostras de solo de áreas representativas de cinco biomas brasileiros.** 2015. 154 p. Tese (Doutorado em

Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

ZIMERMMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology,** Oxford, v. 17, p. 879, 2007.