



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

ELAINE CRISTINA VICENTE BOVI

**Caracterização Molecular e Patogenicidade de Isolados do
Complexo *Metarhizium* spp. à *Diatraea saccharalis*
(Lepidoptera:Crambide) e sua Compatibilidade com
Cotesia flavipes (Hemiptera: Braconodae)**

**São José do Rio Preto
2016**

ELAINE CRISTINA VICENTE BOVI

**Caracterização Molecular e Patogenicidade de Isolados do
Complexo *Metarhizium* spp. à *Diatraea saccharalis*
(Lepidoptera:Crambide) e sua Compatibilidade com
Cotesia flavipes (Hemiptera: Braconodae)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia Industrial, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Eleni Gomes
Co-orientador: Prof^º. Dr. Éder Antônio Giglioti

São José do Rio Preto
2016

Bovi, Elaine Cristina Vicente.

Caracterização molecular e patogenicidade de isolados do Complexo *Metarhizium* spp. à *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e sua compatibilidade com *Cotesia flavipes* (Hemiptera: Braconodae) / Elaine Cristina Vicente Bovi. – São José do Rio Preto, 2016
131 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Coorientador: Éder Antônio Giglioti

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Fungos - Genética. 4. Agentes no controle biológico de pragas. 5. *Metarhizium*. 6. Variação genética. 7. Virulência (Microbiologia) I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 582.28

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

ELAINE CRISTINA VICENTE BOVI

**Caracterização Molecular e Patogenicidade de Isolados do
Complexo *Metarhizium* spp. à *Diatraea saccharalis*
(Lepidoptera:Crambide) e sua Compatibilidade com
Cotesia flavipes (Hemiptera: Braconodae)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia Industrial, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Fernando Barbosa Noll
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Marcia Maria de Souza Moretti
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida
IBCB – Campinas

Prof. Dr. Jeferson Gross
UNESP – Rio Claro

São José do Rio Preto
16 de Dezembro de 2016

Dedido este trabalho

Aos meus pais Sérgio e Cristina, aos meus irmãos Geovane e Eliara, por serem à base da
minha vida, pelo incentivo e amor incondicional.

Á Deus por tudo que representa em minha vida, por sua infinita bondade e por não me
faltar nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sei que a cada passo Ele estava comigo, me dando forças para superar os obstáculos que, aliás, não foram poucos e me proporcionar tudo o que foi necessário para realização de mais esta etapa da minha vida.

A minha orientadora, a professora Dra. Eleni Gomes que me proporcionou a oportunidade de realizar este trabalho principalmente por ter depositado em mim grande confiança. Obrigada pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação profissional, orientação, pelo incentivo, compreensão e amizade.

Ao grande mestre e amigo, Prof. Dr. Éder Antônio Giglioti, por ter sido um exemplo de profissional nesses quase dez anos de convivência, por seu brilhantismo em inovar, sua competência, seu otimismo, sua garra e profissionalismo. Obrigada por sempre me incentivar a me tornar uma profissional melhor capacitada, pela oportunidade de crescimento, aprendizado em diversas áreas, realização profissional e pessoal e muita paciência nos momentos que eu tive dificuldade em entender seus ensinamentos. Não deixando de citar o apoio incondicional ao desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança depositada em mim e por ter sido e ser mestre no sentido literal que a denominação confere me tornando uma profissional de verdade, e pela amizade!!! A sua esposa Dreid Peres Rodero pela compreensão nos momentos de trabalho em sua casa.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, e ao Departamento de Biologia pela oportunidade de realização do doutorado.

A FINEP pelo auxílio financeiro que foi fundamental para realização deste trabalho, pois sem este nada teria sido possível e por fomentar a pesquisa e inovação tecnológica do país.

A empresa Bioenergia do Brasil S/A, por me apoiar e dispor de parte da minha carga horária na empresa para cumprir as disciplinas do doutorado e me capacitar.

Aos amigos do Laboratório de Produção de Agentes Biológicos – Bioenergia do Brasil S/A, pela colaboração, apoio, carinho, dedicação, incentivo e por estarem ao meu lado em horas difíceis e alegres.

Ao professor Dr. Luiz Lehmann Coutinho e toda a sua equipe, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ-USP por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório de Biotecnologia Animal e grupo de pesquisa para me ajudar nas etapas de

sequenciamento para identificação das espécies. Agradeço em especial a técnica Pilar e a responsável técnica Nirlei, primeiramente por sua atenção e dedicação e por ter me ajudado em todas as atividades e principalmente pela amizade. O meu muito obrigada!!

Ao pesquisador Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida do Instituto Biológico e a Dra. Myrian Tigano da EMBRAPA CENARGEM por terem me cedido linhagens de *Metarhizium* e *Beauveria* que serviram como base para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos membros da banca de defesa por terem aceitado o convite, pela leitura e discussão crítica que colaboram com o meu crescimento profissional e aperfeiçoamento do trabalho.

Ao pessoal da SMARTBIO e MYCOFINDER pela amizade, dedicação e ajuda.

A todos os colegas do laboratório de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE – UNESP, Campus de São José do Rio Preto, que compartilharam do doutorado comigo, em especial a Carolina Bezerra e Márcia Morety por terem me acolhido, pela amizade e me ajudado sempre com bons conselhos.

As minhas amigas de longa data, companheiras e “cumadre”, como Patricia Koga e Franciele Vergílio, que fizeram parte dessa fase da minha formação, que muito me ajudaram, principalmente nos momentos mais difíceis, me incentivando sempre a seguir em frente.

A minha nova família de amigos de Piracicaba, que me acolheram com carinho e que tornaram minha mudança e minha nova etapa de vida muito mais fácil e divertida.

Agradeço a meus pais, Sérgio Vicente de Oliveira e Maria Cristina Vicente Bovi, que nunca mediram esforços para oferecer sempre o melhor para mim e meus irmãos, pelo exemplo de lar que nos forneceu e pelo exemplo de vida que são para mim. Essa vitória é fruto da dedicação de vocês! A meus irmãos, Geovane, Eliara e meu tio irmão Fernando que sempre estiverem do lado, me apoiando, principalmente a ajuda do meu irmão no trabalho, pois sem ela não seria possível a minha ausência das responsabilidades e aos meus avós, que são minha base de tudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos!

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

Francisco C. Xavier

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral:	18
2.2 Objetivos específicos:.....	18
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Controle Biológico de pragas agrícolas.....	19
3.2 Controle Biológico de <i>Diatraea saccharalis</i> : um exemplo de programa de controle biológico.	23
3.3 <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
3.3.1 Classificação Taxonômica.....	26
3.3.2 Morfologia e Ciclo de Vida <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
3.4 <i>Cotesia flavipes</i>	30
3.5 Compatibilidade de Agentes de Controle Biológico	32
3.5 Identidade Genética de Fungos Entomopatogênicos.....	35
3.5.1 PCR eletrônico (e-PCR) como ferramenta de identificação.....	42
3.6 Plataformas de Identificação de Microrganismos	43
CAPÍTULO I.....	47
AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E DO TEMPO LETAL (TL ₉₀) DE ISOLADOS DE <i>Metarhizium spp.</i> SOBRE LAGARTAS DE <i>Diatraea saccharalis</i>	47
1-INTRODUÇÃO	48
2-MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Local de execução dos experimentos.	49
2.2 Isolados estudados.	49
2.3 Obtenção de <i>Diatraea saccharalis</i>	50
2.4 Preparo das suspensões de inóculo e viabilidade dos conídios.	50
2.5 Avaliação da virulência de isolados de <i>Metarhizium sp.</i> sobre lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i>	50
2.6 Avaliação do Tempo Letal (TL ₉₀) dos isolados de <i>Metarhizium sp.</i> sobre lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i>	51
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Avaliação da virulência de isolados de <i>Metarhizium sp.</i> sobre lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i>	52
CAPÍTULO II.....	64
AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> COM <i>Cotesia flavipes</i>	64
1- INTRODUÇÃO	65
2-MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 Local de execução dos experimentos.	66
2.2 Isolados estudados.	66
2.3 Obtenção dos indivíduos de <i>Cotesia flavipes</i>	66
2.4 Preparo e viabilidade dos esporos.	66
2.5 Avaliação da Evolução da patogenicidade de diferentes isolados de <i>Metarhizium spp.</i> para <i>Cotesia flavipes</i> em função do tempo	67
2.6 Avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de <i>Metarhizium spp.</i> para <i>Cotesia flavipes</i> após 72HAE.	68
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	69

3.1. Avaliação da Evolução da patogenicidade de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. para <i>Cotesia flavipes</i> em função do tempo	69
120HAE.....	74
3.2 Avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. em <i>Cotesia flavipes</i> após 72HAE	75
CAPÍTULO III	79
IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Metarhizium</i> spp. UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES ITS (Espaçador Transcrito Interno) E EF1- α (Fator de Elongação 1-alfa).....	79
1-INTRODUÇÃO	80
2-MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1 Local de execução dos experimentos.	83
2.2 Isolados estudados.	83
2.3 Extração e Quantificação de DNA	84
2.4 Amplificação e sequenciamento do gene 5'EF1- α e da região ITS dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp. para Identificação Taxonômica, Filogenia e Diversidade Genética ...	85
2.5 Análise Filogenética	87
3.3.4 Caracterização e Genotipagem dos Microsatélites	87
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1 Diversidade, designação taxonômica e filogenia dos isolados de <i>Metarhizium</i>	88
3.1.1 Análises Filogenéticas das Sequências ITS.....	88
3.1.2 Análises Filogenéticas das Sequências 5' EF1- α	92
3.1.3 Análises das Sequências de ITS e 5' EF1- α com dados dos marcadores Microsatélites - SSR	100
3.1.4 Discussão Geral	103
3.1.4.1 Identificação, rastreabilidade e controle de identidade genética	103
3.1.4.2 Associação de <i>Metarhizium</i> com habitats, hospedeiros e virulência	106
CONCLUSÃO GERAL	109
REFERÊNCIAS	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos isolados selecionados de <i>Metarhizium spp.</i> utilizados nos bioensaios.	49
Tabela 2. Média da mortalidade acumulada de <i>Diatraea saccharalis</i> no 5º, 10º e 20º dia após inoculação com os isolados de <i>Metarhizium spp.</i>	54
Tabela 3. Avaliação do tempo sob a mortalidade de <i>D. saccharalis</i> . Médias (% de indivíduos mortos) da mortalidade de <i>Diatraea saccharalis</i> provocada pelo fungo <i>Metarhizium spp.</i> até o 10º dia de avaliação.	57
Tabela 6. Porcentagem da Mortalidade de adultos de <i>Cotesia flavipes</i> após exposição a esporos de vários isolados de <i>Metarhizium spp.</i> , em laboratório, por um período de 24 até 120 horas (HAE) em 25±2°C e 70±10%UR.	71
Tabela 7. Média da Porcentagem da Mortalidade de adultos de <i>Cotesia flavipes</i> de três experimentos após a exposição de esporos de vários isolados de <i>Metarhizium spp.</i> em laboratório por um período de 72 horas (HAE) em 25±2°C e 70±10%UR.	75
Tabela 8. Diferenças entre os pares de bases das sequências 5' EF1- α dos 22 isolados de <i>Metarhizium spp.</i> , sendo <i>M. anisopliae</i> (<i>Ma</i>), <i>M. robertsii</i> (<i>Mr</i>), <i>M. brunneum</i> (<i>Mb</i>) e <i>M. flavoviride</i> (<i>Mf</i>). Números indicando que houve diferenças entre pares de bases quando comparados entre si e entre espécies. Possui um total de 809 posições no conjunto de dados alinhados resultantes.	98
Tabela 9. Tabela demonstrando os 22 isolados de <i>Meatarhizium</i> identificados pelo sequenciamento do gene 5'EF1- α	99
Figura 41. Comparação entre as sequências 5'EF1- α obtidas dos isolados de <i>Metarhizium</i> para demonstrar como exemplo de regiões variáveis entre as espécies que estão destacadas pela cor cinza. Alinhamento realizado e extraído do programa GeneDoc	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conidiogênese e conídios maduros de espécies <i>Metarhizium</i> . Bar = 10 mM. 1-2. <i>Metarhizium majus</i> (ARSEF 1914). 1. Fiálides com o desenvolvimento de conídios. 2. Conídios maduros. 3-4. <i>M. guizhouense</i> . 3. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 7507). 4. Conídios maduros (ARSEF 6238). 5-6. <i>M. pingshaense</i> . 5. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 4342). 6. Conídios maduros (ARSEF CBS 257,90). 7-8. <i>M. anisopliae</i> . 7. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 7487). 8. Conídios maduros (ARSEF 7487). 10/09. <i>M. robertsii</i> . 9. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 727). 10. Conídios maduros (ARSEF 727). 11-12. <i>M. brunneum</i> . 11. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 4179). 12. Conídios maduros (ARSEF 2107). 13-14. <i>M. lepidiotae</i> . 13. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 4628). 14. Conídios maduros (ARSEF 7412). 15-16. <i>M. acridum</i> . 15. Fiálides (ARSEF 6592), observe que ápices das células na conidiogênese engrossam com a produção sucessiva de conídios. 16. Conídios maduros (ARSEF 5736). 17-18. <i>M. globosum</i> . 17. Fiálides (ARSEF 596). 18. Conídios maduros (ARSEF 2596). 19. <i>M. flavoviride</i> . Conídios maduros (ARSEF 2025). 20. <i>M. frigidum</i> . Conídios maduros (ARSEF 4124) (BISCHOFF, 2009).	28
Figura 2. Ciclo biológico do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	30
Figura 3. Fluxograma que ilustra os princípios da análise de amostras ambientais utilizando técnicas moleculares baseadas em PCR.	36
Figura 4. Taxa de mortalidade (%) de lagartas de <i>Diatraea accahralis</i> proporcionada por cada isolado do fungo <i>Metarhizium</i> spp. nos diferentes dias de avaliação (5°, 10° e 20° dia)	55
Figura 5. Lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> parasitadas pelo fungo <i>Metarhizium</i> spp.	55
Figura 06. TL ₉₀ do MBIO 01 repetição 1, 2 e 3 respectivamente	58
Figura 07. TL ₉₀ do MBIO 02 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	58
Figura 08. TL ₉₀ do MBIO 03 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	58
Figura 09. TL ₉₀ do MBIO 04 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	58
Figura 10. TL ₉₀ do MBIO 05 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	59
Figura 11. TL ₉₀ do MBIO 06 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	59
Figura 12. TL ₉₀ do MBIO 07 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.....	59
Figura 13. TL ₉₀ do MBIO 08 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	59
Figura 14. TL ₉₀ do MBIO 09 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	60
Figura 15. TL ₉₀ do MBIO 10 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	60
Figura 16. TL ₉₀ do MBIO 11 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	60
Figura 17. TL ₉₀ do MBIO 12 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	60
Figura 18. TL ₉₀ do MBIO 13 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	61
Figura 19. TL ₉₀ do MBIO 14 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	61
Figura 20. TL ₉₀ do MBIO 15 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	61
Figura 21. TL ₉₀ do MBIO 16 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	61
Figura 22. TL ₉₀ do MBIO 17 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	62
Figura 23. TL ₉₀ do MBIO 18 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	62
Figura 24. TL ₉₀ do MBIO 19 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	62
Figura 25. TL ₉₀ do MBIO 20 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	62
Figura 26. TL ₉₀ do IBCB 425 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.	63
Figura 27. TL ₉₀ do ESALQ 1037 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.....	63
Figura 28. Média da mortalidade de <i>C. flavipes</i> inoculadas com os 20 isolados de <i>Metarhizium</i> estudados nos dias após a inoculação em laboratório.	72

Continuação. Média da mortalidade de <i>C. flavipes</i> inoculadas com os isolados de <i>Metarhizium</i> estudados nos dias após a inoculação em laboratório.....	73
Figura 29. Área abaixo da curva de evolução da mortalidade – AACEM de cada isolado as 48HAE.....	74
Figura 30. Área abaixo da curva de evolução da mortalidade – AACEM de cada isolado as 72HAE.....	74
Figura 31. Área abaixo da curva de evolução da mortalidade – AACEM de cada isolado as 120HAE.....	74
Figura 32. Percentual de mortalidade dos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. ao parasitoide <i>Cotesia flavipes</i> representados em três grupos de acordo com o grau da patogenicidade.....	78
Figura 33. Proporção das médias de patogenicidade dos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. a <i>Cotesia flavipes</i> , formando três grupos de acordo com o grau da patogenicidade.....	78
Figura 34. Esquema e mapa das posições dos primers EF1-a (RENHER, 2005).....	82
Figura 35. Esquema da região do rDNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2 (LUPATINI, 2008).....	83
Figura 36: Padrão de amplificação do gene ITS dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp., observado em gel de agarose. M: Marcador de peso molecular 100pb Ladder DNAMarker (100-2000pb), com indicadores de tamanho, em pares de base.....	89
Figura 37. Árvore filogenética da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos 22 isolados de <i>Metarhizium</i> pré-selecionados estudados no presente trabalho com as sequências de referência do GeneBank com o número de acesso indicado. O método utilizado para a construção da árvore foi Neighbor-Joining sendo as distâncias evolutivas calculadas utilizando o método de Tamura-Nei. A confiança foi confirmada com 1000 repetições de bootstrap.....	91
Figura 38: Padrão de amplificação do gene EF1- α dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp., observado em gel de agarose. M: Marcador de peso molecular 100pb Ladder DNAMarker (100-2000pb), com indicadores de tamanho, em pares de base.....	92
Figura 39. Árvore filogenética das sequências do gene 5' EF1- α dos 22 isolados de <i>Metarhizium</i> pré-selecionados estudados no presente trabalho com as sequências de referência do GeneBank com o número de acesso indicado. O método utilizado para a construção da árvore foi Neighbor-Joining sendo as distâncias evolutivas calculadas utilizando o método de Tamura-Nei. A confiança foi confirmada com 1000 repetições de bootstrap.....	96
Figura 40. Diversidade morfológica e fenotípica das colônias dos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.....	97
Continuação. Diversidade morfológica e fenotípica das colônias dos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.....	98
Figura 41. Comparação entre as sequências 5'EF1- α obtidas dos isolados de <i>Metarhizium</i> para demonstrar como exemplo de regiões variáveis entre as espécies que estão destacadas pela cor cinza. Alinhamento realizado e extraído do programa GeneDoc.....	99
Figura 42. Dendrograma baseado na similaridade de Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA pela análise dos alelos gerados por oito locos SSR de isolados de <i>Metarhizium</i> spp.. A consistência dos nós foi obtida através de 10.000 reamostragens “bootstrap”	102

RESUMO

A broca da cana-de-açúcar é considerada a principal praga da cultura, cujo controle químico não tem sido eficaz. O controle biológico com *Cotesia flavipes*, em função da expansão do plantio, não será suficiente para o controle em áreas de alta infestação. O clima quente e úmido das regiões Noroeste e Centro-Oeste do Estado de São Paulo potencializam a utilização dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle desta praga. O presente trabalho teve como objetivos estudar as variações genéticas dentre uma população pré-selecionada de 20 isolados de *Metarhizium* spp. associada ao controle de *Diatraea saccharalis* para identificar espécies e isolados com potencial de uso como agentes para o controle desta praga e a compatibilidade dos mesmos com o parasitoide *Cotesia flavipes* para serem utilizados em programas de manejo integrado dessa praga-MIP. Neste sentido, foram realizados testes para determinação da agressividade desse grupo de isolados de *Metarhizium* spp. previamente selecionados sobre *D. saccharalis*. Os isolados foram inicialmente caracterizados quanto ao potencial de patogenicidade, posteriormente foi realizada a seleção de cepas com alta eficiência de infecção sobre a *D. saccharalis* através da TL₉₀. Também foi realizada a avaliação da compatibilidade dos isolados selecionados de *Metarhizium* spp. com o parasitoide *C. flavipes* para serem utilizados juntamente em programas de Manejo de Pragas – MIP. Os resultados do presente estudo demonstraram que todos os isolados avaliados demonstraram elevada virulência contra lagartas de *D. saccharalis*, sendo possível comprovar a eficiência desses isolados no controle dessa praga, porém eles mostraram diferenças na distribuição da mortalidade ao longo do tempo, sendo que a estimativa do tempo letal para matar 90% de uma população de insetos (TL₉₀), variou de 5,39 dias para M 13 a 7,49 dias para M 20. Além do mais, os resultados dos testes de compatibilidade demonstraram que a maioria dos isolados do fungo *Metarhizium* spp. apresentaram algum grau de patogenicidade à *C. flavipes*, destacando a importância dos experimentos de seleção para obtenção de isolados menos patogênicos, sendo possível a seleção de apenas dois isolados não patogênicos ao parasitoide *C. flavipes*, o M 01 e o M 19, com resultados semelhantes ao da testemunha. Além disso, foi avaliada a diversidade genotípica e realizada a caracterização molecular e identificação específica dos isolados de *Metarhizium* spp. do estudo, através do sequenciamento do espaçador transcrito interno (ITS1 e ITS2) e da região 5' do fator de alongamento da tradução 1 alfa (5'EF1- α). Os isolados estudados com ITS se agruparam junto as espécies de *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. piganhaense*, *M. brunneum* e *M. guizhouense* e identificados 8 haplótipos, ou seja, ITS não teve uma boa resolução para definir as espécies, não podendo

então, ser definida e identificada a espécie de cada isolado. Apesar de ITS ser uma técnica muito utilizada para identificação de fungos no mundo todo, neste trabalho, verificou uma dificuldade para reconstruir a filogenia, dificultando a sua utilização como sequência diagnóstica na identificação ou análise filogenética de espécies mais próximas de *Metarhizium*. A análise filogenética das sequências de EF1 revelou agrupamentos que identificaram os isolados analisados em quatro espécies, *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. brunneum* e *M. flavoviride*, determinando a identidade taxonômica de todos os isolados utilizados neste trabalho, demonstrando que *M. anisopliae* foi a espécie mais frequente entre os isolados selecionados com 73% de todos eles, seguido por 18% de *M. robertssi*. As sequências geradas para a região 5' EF1- α revelou uma diversidade total de 13 haplótipos dentre os 22 isolados, sendo nove haplótipos pertencentes a *M. anisopliae* e dois a *M. robertssi*, sendo correspondentes aos dados obtidos com microssatélites -SSR para os mesmos 22 isolados com 17 haplótipos, evidenciando a existência de uma diversidade bem alta entre os isolados, pois, os isolados selecionados do presente estudo já vieram de uma seleção de indivíduos com padrões SSR diferentes, gerando assim uma alta diversidade intra-específica entre eles. Desta forma, o uso do polimorfismo da região 5' EF1- α poderá ser utilizada para o desenvolvimento de primers e sondas específicas para detecção, identificação e pureza genética, certificação, rastreabilidade e controle de qualidade de isolados de *Metarhizium* spp. Os resultados indicam que o fungo *M. anisopliae* é importante para ser utilizado no controle da *D. saccharalis*, e que alguns isolados são compatíveis com o parasitoide *C. flavipes*, podendo desta maneira serem utilizados juntamente no MIP e atuar sinergicamente no controle de *D. saccharalis* contribuindo para a sustentabilidade da agricultura canavieira no sudeste do Brasil.

Palavras-chave: Controle biológico. *Metarhizium*. Filogenia. Diversidade Genética. Virulência. Patogenicidade.

ABSTRACT

The sugarcane borer is considered as a major crop pest, whose chemical control has not been very effective. The biological control by *Cotesia flavipes*, due to the expansion of the plan, are not enough to control in areas of high infestation. The hot and humid climate of the Northwest and Midwest regions of São Paulo state potentiate the utilization of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control this pest. The present work aims to study the genetic variations among a pre-selected population of 20 isolates of *Metarhizium spp.* associated to the control of *Diatraea saccharalis* to identify species and isolates with potential of use as agents for the control of this pest and their compatibility with the *Cotesia flavipes* parasitoid to be used in Integrated Pest Management (IPM) programs. In this sense, the tests were carried out to aggressiveness determination of this *Metarhizium spp* isolate groups previously selected on *Diatraea saccharalis*. The isolates were initially characterized for the pathogenicity potential, later the strain selection was made of highly efficient of infection on *D. saccharalis* through TL₉₀. Also was made the evaluation of *Metarhizium spp* selected isolates compatibility with the *Cotesia flavipes* parasitoid to be used together in Integrated Pest Management (IPM) programs. The results of the present study demonstrated that all the isolates evaluated showed high virulence against *D. saccharalis* caterpillars, and being possible to prove the efficiency of these isolates in the control of this pest, but they showed differences in mortality distribution over time, and the estimate of the lethal time to kill 90% of insect population (TL₉₀) ranged from 5.39 days for M13 to 7.49 days for M20. Moreover, the results of the compatibility tests showed that most of the isolates of the *Metarhizium spp.* fungus presented some toxicity degree to *C. flavipes*, emphasizing the importance of the experiments to selection to obtain less toxic isolates, being possible the selection of only two non-toxic isolates to *C. flavipes* parasitoid, the M 01 and M 19, with similar results of the standart. Moreover, the genotypic diversity was evaluated and made the molecular characterization and specific identification of the isolates of *Metarhizium spp.*, by the internal

transcribed spacer sequencing (ITS1 and ITS2) and the 5' region of 1 alpha translation stretch factor (5'EF1- α). The isolates studied with ITS were grouped together with the species *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. piganhaense*, *M. brunneum* and *M. guizhouense* and identified 8 haplotypes, that is, ITS did not have a good resolution to define the species, because was not able to separate very close species, and can not be defined and identified the species of each isolate. Although ITS is a widely used technique for fungi identification worldwide, in this work, it was unable to reconstruct the phylogeny, making it difficult to use as a diagnostic sequence in the identification or phylogenetic analysis of species closer to *Metarhizium*. The phylogenetic analysis of the EF1 sequences revealed clusters that identified the isolates analyzed in four species, *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. brunneum* and *M. flavoviride*, determining the taxonomic identity of all the isolates used in this work, demonstrating that *M. anisopliae* was the most frequent species among the selected isolates with 73% of them, followed by 18% of *M. robertssi*. The sequences generated for the 5'EF1- α region revealed a total diversity of 13 haplotypes among the 22 isolates, being nine haplotypes belonging to *M. anisopliae* and two to *M. robertssi*, corresponding to the data obtained with microsatellites -SSR for the same 22 isolates with 17 haplotypes, evidencing the existence of a very high diversity among the isolates, because, the isolates selected from the present study have already come from a individuals selection with different SSR patterns, generating a high intra-specific diversity among them. Thus, the use of the 5'EF1- α region polymorphism may be used for the primers and specif probes development to detection, identification and genetic purity, certification, traceability and quality control of *Metarhizium* spp. isolates. The results indicate that the *M. anisopliae* fungus is important to be used in the control of *D. saccharalis*, and that some isolates are compatible with the *C. flavipes* parasitoid, which can be used together in the IPM and act synergistically in *D. saccharalis* control contributing to the sustainability of sugarcane agriculture in southeast Brazil.

Key words: Biological control. *Metarhizium*. Phylogeny. Genetic diversity. Virulence. Toxicity.

1- INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e país líder em produção de açúcar, no entanto, todos os anos perdem-se milhões de reais com os prejuízos causados pelo ataque de pragas a essa cultura. A broca da cana-de-açúcar, a *Diatraea saccharalis*, é uma das principais pragas que ataca a cultura da cana, causando perdas diretas e indiretas da produção. Os danos diretos são decorrentes da morte das gemas, perfuração de galerias, coração morto, perda de peso. Os danos indiretos incluem perdas da qualidade da cana em função de ataques secundários ao colmo, como a podridão vermelha, causadas por fungos que penetram nos orifícios abertos pela broca e causam a inversão da sacarose e queda acentuada no rendimento de sacarose por tonelada de cana (PALLINI et al., 2009).

Sendo assim, medidas para o controle desta praga são exigidas anualmente. O controle químico, além do alto custo financeiro e ambiental, não tem apresentado efeitos desejados, principalmente em áreas de grande infestação. Alternativas de controle por agentes biológicos podem ser utilizadas as quais tem mostrado maior eficiência a longo prazo.

O clima quente e úmido nas regiões canavieiras potencializam a utilização de fungos entomopatogênicos como agentes de controle da broca da cana. Entre esses, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são muito utilizados como bioinseticidas de amplo espectro. Porém, por se tratarem de organismos vivos e sujeitos a pressão seletiva do ambiente, as cepas podem apresentar sua capacidade de infecção da praga alterada e, com isso, a eficiência do controle pode ser afetada. Um grande desafio para a aplicação do controle biológico no Brasil é o subaproveitamento de uma riqueza natural: a sua ampla biodiversidade. “Apesar de ser imensa, nossa biodiversidade é pouco conhecida, pouco investigada e pouco explorada”, disse Parra (2014), ressaltando que aí poderiam ser encontradas fontes naturais para o combate de diversas pragas e ainda isolados fúngicos mais eficientes para o controle da praga em questão.

Com base nessas considerações, foi proposto um trabalho com a finalidade de selecionar e estudar as variações de uma população de *Metarhizium anisopliae* associadas ao controle da *Diatraea saccharalis*, previamente selecionada de diversos isolados da biodiversidade brasileira, para identificar microrganismos com potencial de uso como agentes para o controle desta praga e a compatibilidade dos mesmos com o parasitoide *Cotesia flavipes* para serem utilizados em programas de manejo da praga - MIP e ainda identificação dos isolados através de regiões específicas como ITS e EF1. Para tanto, o

trabalho foi dividido em três capítulos que abordaram de maneira mais específica cada assunto investigado, o capítulo I abordou a performance e virulência dos isolados de *Metarhizium* spp. sob a *Diatraea saccharalis* e o Tempo Letal - TL₉₀ que os isolados levariam para matar 90% da população da praga, no capítulo II foram realizados os testes de patogenicidade e compatibilidade do fungo com o parasitoide *Cotesia flavipes* e no capítulo III regiões conservadas e informativas dos isolados foram sequenciadas para identificação das espécies e diversidade genética.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O presente trabalho teve como objetivo estudar as variações dentro uma população pré-selecionada de 20 isolados de *Metarhizium* spp. superiores associada ao controle de *Diatraea saccharalis* para identificar microrganismos de alta performance, ou seja, mais virulentos para o controle desta praga e menos agressivos a *Cotesia flavipes*, apresentando compatibilidade entre si para serem utilizados em programas de manejo da praga e ainda identificar taxonomicamente as espécies de *Metarhizium* estudadas e sua diversidade genética. Para tanto os isolados obtidos foram avaliados quanto à virulência, TL 90, patogenicidade e a sua identidade genética, através de regiões conservadas como espaçador transcrito interno - ITS e fator de alongação -EF1- α .

2.2 Objetivos específicos:

- a) determinação da agressividade dos 20 isolados de *Metarhizium* spp. sobre *Diatraea saccharalis*;
- b) seleção de cepas com alta eficiência de infecção sobre a *D. saccharalis* através da TL₉₀ (Tempo letal para matar 90% da população);
- c) avaliação da compatibilidade dos isolados selecionados de *Metarhizium* spp. com o parasitoide *Cotesia flavipes*;
- d) sequenciamento das regiões conservadas como espaçador transcrito interno - ITS e fator de alongação -EF1- α dos isolados de *Metarhizium* spp;
- e) identificação ao nível de espécie dos isolados de *Metarhizium* spp. potencialmente selecionados para uso como agentes para o controle de *Diatraea saccharalis*; e
- f) caracterização molecular, análises filogenéticas e diversidade genética da população pré-selecionada de *Metarhizium* spp.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Controle Biológico de pragas agrícolas

Embora os pesticidas químicos apresentem alta e rápida eficiência para matar ampla gama de insetos pragas e fungos patogênicos e relação benefício/custo compensatória, seus efeitos adversos ao longo do tempo são problemáticos. O uso contínuo proporciona pressão de seleção e conseqüente surgimento de populações de insetos e patógenos resistentes aos agrotóxicos, requerendo doses mais elevadas ou mais produtos tóxicos (DALZOTO & UHRY, 2009; PEREIRA et al., 2010). Além disso, trazem consigo uma série de efeitos negativos à saúde ambiental e humana, contaminação do solo e da água, perda da biodiversidade e intoxicações residuais em humanos e animais (TONUS, 1999, VALÉRIO et al., 2000). Para Darolt (2001) a ideia de que quanto maior o consumo de defensivos, maior é a produção agrícola de um país, está mudando. Atualmente, considera-se o custo ecológico da utilização desses produtos. Uma conscientização quanto às adversidades causadas pelo uso abusivo de agrotóxicos, está gerando nos consumidores uma busca por alimentos mais saudáveis, permitindo, assim, que a agricultura orgânica cresça bastante. É possível que a agricultura alternativa aumente consideravelmente nos países em desenvolvimento. Atualmente, no Brasil, a área cultivada com agricultura orgânica é de apenas 100 mil hectares, enquanto na Europa é superior a 2 milhões de hectares (DAROLT, 2001).

Através da consciência dos riscos dos pesticidas e para minimizar tais efeitos negativos e caminhar rumo à agricultura sustentável, existe uma demanda global pelo uso de pesticidas biológicos, incluindo aqueles cujo princípio ativo são esporos de fungos que parasitam insetos e a utilização de insetos predadores ou parasitoides. A segurança oferecida por inseticidas microbianos é a sua maior força. O controle biológico é não poluente, não provoca desequilíbrios biológicos, é duradouro e aproveita o potencial biótico do agroecossistema, não sendo tóxico ao homem e animais (ALVES & ALMEIDA, 1997).

De acordo com Pallini (2009) algumas vantagens de usar o controle biológico ao produto químico são: i) redução de exposição dos produtores e técnicos, ii) ausência de resíduos de pesticidas em alimentos, iii) risco muito baixo de poluição ambiental, iv) ausência de período de carência entre a liberação de inimigos naturais e colheita, v) apreciação por parte do público que começou a exigir produtos livres de pesticidas, vi)

ação tóxica de inseticidas microbianos específica para um único grupo ou espécies de insetos, vii) os microrganismos patogénicos pode estabelecer-se em uma população de pragas ou no seu habitat e fornecer controle de pragas durante gerações subsequentes ou temporadas, e viii) aumento do crescimento das raízes e da planta por meio de favorecer a microflora benéfica do solo, causando aumento da produtividade da cultura. O controle biológico apresenta um efeito mais lento do que o químico, sendo necessárias, portanto, mudanças na política de manejo de insetos-praga. O combate com defensivos químicos normalmente é feito em momentos em que o dano já está consolidado e é preciso uma resposta rápida. No controle biológico procura-se manter os insetos-praga em baixo número, exigindo monitoramento e ações antecipadas. Assim, é possível ter um controle efetivo sem efeitos nocivos (LAZZARINI, 2005).

O controle biológico de insetos não é uma técnica recente. Desde o séc III a.C., formigas predadoras eram utilizadas pelos chineses para controlar pragas em plantas cítricas. Na Arábia Medieval os agricultores transportavam colônias de formigas predadoras para o controle de formigas fitófagas em palmáceas (CARVALHO, 2006). Segundo a revista Life Sciences (2015), enquanto o primeiro registo realizado de um pesticida microbiano foi com a EPA dos EUA em 1948, pesquisas pioneiras muito mais antigas, no século 19 pelo Professor Ilya Metchnikoff (Professor de Microbiologia na Universidade de Odessa) levou a Ucrânia a ser o primeiro país a estabelecer uma planta de produção em escala industrial para um pesticida microbiano. Teorias do professor Metchnikoff, de que determinadas pragas poderiam ser controladas através da aplicação de microrganismos iriam levá-lo a descobrir o uso do fungo *Metarhizium anisopliae* para controlar besouro do trigo e a produção em massa subsequente deste pesticida microbiano. Apesar de serem os pioneiros no desenvolvimento de produtos microbianos, a agricultura na Ucrânia na década de 1950 foi em comum com outros países desenvolvidos, fortemente dependente de produtos químicos, efetivamente parando o desenvolvimento de novos agentes microbianos de controle de pragas (LIFE SCIENCES, 2015).

No final dos anos 1960, a China também desenvolveu um mercado de biopesticida próspero com centenas de pequenos produtores não regulados que forneciam preparações "não formulados" do fungo *Beauveria bassiana*, para controle de pulgões, gorgulhos, besouros e principalmente a lagarta do pinheiro de Masson (*Dendrolimus punctatus*), o desfolhador de floresta mais grave da China, sendo o maior programa de controle biológico do país. Em outubro de 2008, havia 327 biopesticidas registradas na China, ou seja, mais do que qualquer outro país do mundo, respondendo por 1,6% do total

de produtos agrotóxicos registrados (Instituto para o Controle de Agrotóxicos, Ministério da Agricultura (ICAMA, 2008). Em contrapartida, a dependência quase completa de Cuba a pesticidas químicos durante os anos 1960 e 1970 levou ao surgimento acelerado de cepas resistentes às pragas. Isso, combinado com embargos comerciais com os EUA e o colapso depois de seu maior parceiro comercial, a União Soviética, resultaram em restrição de fornecimentos de pesticidas químicos e levaram o Governo cubano a implementar o Manejo Integrado de Pragas (MIP) como política de controle de praga oficial do país. Isso alavancou pesquisa e desenvolvimento de pesticidas biológicos produzidos em massa de tal forma que Cuba se tornou um dos países líderes no mundo na produção de agentes biológicos para controle de pragas (LIFE SCIENCES, 2015).

Na África, a proibição de aplicação de inseticidas tóxicos, tais como Dieldrina para controlar gafanhotos levaram ao financiamento internacional para o desenvolvimento de um método de controle biológico. Isto foi possível através do Programa LUBILOSA, um programa de investigação que visava desenvolver uma alternativa biológica para o controle químico de gafanhotos, através do desenvolvimento de um micoinseticida baseado no fungo *Metarhizium acridum* (LOMER et al., 2001). Foi um dos programas de controle biológico utilizando fungos mais conhecido do mundo, com resultados de campo realizados no final 1990 revelando ser igualmente fiável com aplicações aéreas, geralmente com controle de pragas superior a padrões químicos e efeitos negativos mínimos sobre o meio ambiente (LANGEWALD et al., 1999). Em 2009, o biopesticida foi usado para tratar cerca de 10.000 hectares de zonas húmidas infestadas com gafanhotos vermelhos (*Nomadacris septemfasciata*) para evitar uma invasão que podia ter afetado as culturas alimentares de cerca de 15 milhões de pessoas (NORTHOFF, 2009).

No Brasil, existem vários casos de sucesso do uso do controle biológico em várias culturas. A cultura da cana no Brasil é altamente tecnificada e possui um dos maiores programas de controle biológico do mundo, onde a praga é controlada com o inimigo natural *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae), um agente de controle eficiente, numa área de cerca de dois milhões de hectares em 2008 (PINTO, 2008) e chegando a três milhões de hectares (PARRA et al., 2010). A *D. saccharalis* pode ser combatida com parasitoides, predadores e entomopatógenos (ALVES; LOPES, 2008; MACEDO; BOTELHO, 1988). Com a introdução desse parasitoide *C. flavipes* no Brasil, observou-se que a intensidade de infestação por *D. saccharalis* caiu de 11% para 2,8%, sendo liberados 14,8 bilhões de vespas em 2,44 milhões de hectares com um custo total de

R\$ 88,4 milhões (GALLO et al., 2002, POLANCZYK, 2004), deixando-se de aplicar 700.000 L de defensivos agrícolas contra a praga (POLANCZYK, 2004).

Nos estados do Nordeste e Sudeste, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. vem sendo utilizado com grande sucesso no controle da cigarrinha *Mahanarva posticata* desde a década de 1970 (STAL, 1855) (Hemiptera: Cercopidae) na cultura da cana-de-açúcar correspondendo a um dos mais bem sucedidos programas de controle biológico na América Latina e também no controle de cigarrinhas que atacam pastagens (ALVES; LOPES, 2008). Foram realizados estudos de coleta e seleção de isolados com diferentes graus de virulência, de especificidade para cada praga visada e de adaptação a condições ambientais diversas. O uso deste fungo tem demonstrado eficiência que variou de 30 a 80% no controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar e de 10 a 60% no controle das cigarrinhas das pastagens (ALVES, 1998).

Mundialmente, em 2010, existiam cerca de 1400 produtos (biopesticida) no mercado, sendo que esses produtos representam apenas 2,5 % do mercado de pesticidas totais (BAILEY, 2010). Marrone (2007) estimou que o setor de biopesticidas terá uma taxa anual composta de cinco anos de crescimento de 16 % (em comparação com 3% de pesticidas sintéticos), que deverá produzir um mercado global de \$ 10 bilhões até 2017. No entanto, o mercado pode precisar de aumentar substancialmente mais do que isso, se os biopesticidas desempenharem um papel pleno na redução da nossa dependência excessiva de pesticidas químicos sintéticos.

O Brasil é um dos poucos países do mundo detentores da chamada mega diversidade biológica, ou seja, de ecossistemas importantes ainda íntegros. Essa biodiversidade pode oferecer uma oportunidade ímpar para o controle biológico de pragas no país, como também, em outros países do mundo, com a identificação de novos organismos vivos com potencial de serem utilizados no controle biológico. A tendência do uso do controle biológico de pragas é aumentar consideravelmente no âmbito global, atendendo às demandas internacionais na utilização de práticas agrícolas menos agressivas ao meio ambiente (CANCELA, 2015). No entanto, apesar de tanta diversidade, o IBCB 425, pertencente a coleção do Instituto Biológico é o único isolado de referência autorizado para utilização em agricultura orgânica no Brasil (INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA SDA/SDC Nº 2, DE 12 DE JULHO DE 2013), pois se destacou em diversos trabalhos no controle de *Mahanarva fimbriolata* e *Deois flavopicta*.

O principal desafio para escalar e globalizar o uso do controle biológico (GRAVENA, 1992) continua sendo a seleção de novos agentes, novas estratégias e desenvolvimento de produtos inovadores com alta eficiência de controle e capacidade adaptativa.

3.2 Controle Biológico de *Diatraea saccharalis*: um exemplo de programa de controle biológico.

Em virtude dos prejuízos ocasionados por *Diatraea saccharalis*, a broca da cana-de-açúcar, torna-se indispensável o seu controle. Para utilização de qualquer método de controle, o primeiro passo é fazer o levantamento da infestação da broca, através da determinação da intensidade de infestação (MARQUES et al., 2006). Este é um índice que permite avaliar o ataque de broca na matéria prima que é processada após a colheita (MACEDO; LAVORENTI, 2004). O controle de *D. saccharalis* é realizado por diversas táticas que auxiliam na redução da população da broca, tais como o plantio da cana-de-açúcar em épocas desfavoráveis ao desenvolvimento da praga, o emprego de variedades mais resistentes e o uso de armadilhas de feromônio com fêmeas virgens (SEGATO et al., 2006). Dentre as táticas de controle mais utilizadas, destaca-se o controle químico e biológico.

O controle químico tem sido a tática de controle mais comumente utilizada para a manutenção da população de *D. saccharalis* abaixo do nível de dano econômico nas culturas de cana-de-açúcar e milho (CRUZ, 2007). Dentre os inseticidas e dosagens registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso em cana-de-açúcar visando o controle da broca *D. saccharalis* pode-se citar triflumuron, fipronil e carbofuran (MAPA/AGROFIT, 2010). O inseticida triflumuron é um regulador de crescimento pertencente ao grupo das benzoiluréias e atua inibindo a biossíntese de quitina dos lepdópteros. O fipronil pertence ao grupo dos fenilpirazóis e atua no bloqueio da passagem de íons de cloro pelos receptores mediados pelo GABA e dos canais de glutamato-cloro danificando o sistema nervoso central do inseto. O carbofuran pertence ao grupo dos carbamatos e atua como inibidor da acetilcolinesterase que é um neurotransmissor (IRAC, 2009).

No entanto este inseto é de difícil controle devido, principalmente, à localização das larvas no interior dos colmos das plantas onde ocorrem os maiores prejuízos, pois, nesta fase, o controle químico, com o uso de inseticidas, torna-se inviável devido ao alto

custo e baixa eficiência dos produtos que são incapazes de atingir as lagartas no interior dos colmos (ODUM,1985). A utilização de inseticidas químicos para o controle da broca-da-cana, também não é recomendada devido aos prejuízos ambientais provocados, possibilidade de evolução da resistência da *D. saccharalis* e pela forma de aplicação dos mesmos na lavoura, que torna difícil a sua penetração no interior dos colmos onde as lagartas provocam os maiores prejuízos.

Devido a essas restrições e a necessidade de alternativas seguras aos inseticidas químicos, tem-se aumentado o interesse por agentes biológicos para o controle desta praga para substituir substâncias químicas (inseticidas e pesticidas) (ODUM,1985). Esse processo tem como finalidade manter as espécies de pragas em níveis aceitáveis por meio da introdução de um predador natural, parasitóide ou micro-organismo que lhe cause doença ou morte (BRAGA et al., 2003).

No Brasil, o método mais utilizado é o controle biológico pelo parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) (BOTELHO & MACEDO, 2002; SEGATO et al., 2006). Nesse sistema, o parasitismo se inicia pela inserção do ovopositor da vespa, que injeta grande quantidade de ovos e outras substâncias no hospedeiro. Destes ovos eclodem larvas da vespa, que se alimentam dos tecidos da broca até que esta morra exaurida, sem conseguir completar o seu ciclo de vida (SEGATO et al., 2006). Outro inimigo natural promissor ao controle da broca é o microhimenóptero *Trichogramma galloi* que ataca ovos de lepidópteros. O parasitóide vem sendo produzido em larga escala em laboratórios e suas liberações tem mostrado que é um eficiente regulador da população da praga (BOTELHO et. al., 1995).

O sucesso do controle biológico da *D. saccharalis* obtido com a *C. flavipes* foi consolidado a partir da década de 1970 no Brasil, devido à facilidade de criação massal e a capacidade desta vespinha em localizar seu hospedeiro (GALLO *et al.*, 2002; PINTO, 2006). Porém, com a rápida expansão da cultura da cana-de-açúcar, a produção dos parasitoides *C. flavipes* teria que acompanhar esse aumento, o que não foi possível. Assim, a utilização de outros métodos de controle, como os fungos entomopatogênicos, incrementará o controle biológico da broca da cana-de-açúcar, além de contribuir na manutenção da baixa utilização de agrotóxicos para o controle de *D. saccharalis* (ZAPPELINI, 2010).

O número de fungos com potencial para emprego como controladores biológicos já ultrapassa 750 espécies e 85 gêneros (PUTZKE & PUTZKE, 2002). Além disso, os fungos são patógenos de amplo espectro, capazes de atacar diversas espécies de insetos e

de causar epizootias naturais. São versáteis, podendo infectar diferentes estádios de desenvolvimento dos hospedeiros (ALVES, 1998b). Portanto, dentre os agentes microbianos de controle, os fungos são de extrema importância, sendo que os Hifomicetos possuem muitas características desejáveis para um patógeno (GASSEN, 2006).

Os fungos entomopatogênicos geralmente infectam seus hospedeiros através de esporos especializados que se fixam para germinar e penetrar o tegumento. O fungo penetrante se multiplica na hemocele do hospedeiro e a morte deste ocorre geralmente dentro de três a dez dias após a infecção, por perda de água, privação de nutrientes, danos mecânicos graves e ação de toxinas. Sob condições favoráveis, o fungo esporula amplamente sobre o cadáver para facilitar novas infecções na população de hospedeiros e então continuar o ciclo da doença (CHANDLER et al., 2000).

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* é mundialmente conhecido e utilizado como agente biocontrolador de inúmeras pragas agrícolas. As várias espécies de *Metarhizium* apresentam potencial de controle para diversas ordens de insetos (BRIDGE et al. 1990, ALVES 1992, PEREIRA et al. 1993), inclusive para lepidópteros, pragas como *Plutella xylostella*, *Alabama argillacea* e *D. saccharalis*.

De acordo com Alves (1998b) e Coutinho (2008), *D. saccharalis* é suscetível a *Metarhizium anisopliae*, sendo que esse fungo ocorre naturalmente em cerca de 10% das lagartas nas condições do Nordeste. Estes fungos são patogênicos para todos os estágios de desenvolvimento da broca, sendo altamente eficiente para ovos de um a dois dias de idade. Em experimentos realizados em condições de campo, foi constatada a infecção de 58% de lagartas por *M. anisopliae* e 44% por *B. bassiana*, com dosagem de 10^{13} conídios/ha.

As lagartas da broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis*, quando submetidas a um elevado potencial de inóculo de *B. bassiana*, sob temperatura média de 25° C e UR 90% após 48 horas, reduzem a sua alimentação, parando o processo após 72 horas. Em geral, 96 horas depois da inoculação ocorrem 100% de mortalidade e o fungo passa a crescer saprofiticamente (ALVES 1998b).

Folegatti (1985) concluiu que a aplicação conjunta de *M. anisopliae* e *C. flavipes* é mais eficiente que a aplicação do fungo isoladamente. E ainda observou que o fungo *M. anisopliae* não se mostrou patogênico aos diferentes estágios de desenvolvimento da vespa. Logo, os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* podem ser utilizados como mais dois agentes de biocontrole a broca da cana-de-açúcar, vindo a incrementar o manejo integrado de pragas na cultura da cana-de-açúcar.

3.3 *Metarhizium anisopliae*

3.3.1 Classificação Taxonômica

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um deuteromiceto, pertencente à ordem Hypocreales (Ascomycota), família motosporic Clavicipitacea. *Metarhizium* é um dos gêneros conhecidos de fungos entomopatogênicos mais estudados, comumente conhecido como “fungo da muscardine verde”. *M. anisopliae* foi descrito pela primeira vez na Rússia como um patógeno do besouro de trigo, *Anisoplia austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae) por Metschnikoff, em 1879 como *Entomophthora anisopliae* (DRIVER, 2000).

O primeiro trabalho de controle microbiano realizado por este pesquisador, foi para o controle de larvas de *Anisoplia austriaca*, sendo finalmente classificado por Sorokin em 1883 como *Metarhizium anisopliae* (TULLOCH, 1976), propondo a seguinte classificação taxonômica:

Super-reino: Eukaryota

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

Filo: Ascomycota

Subfilo: Pezizomycotina

Classe: Sordariomycetes

Ordem: Hypocreales

Família: Clavicipitacea

Gênero: *Metarhizium*

Espécie: *Metarhizium anisopliae*

Antes da revisão de Tulloch (1976), 13 espécies de *Metarhizium* e duas variedades tinham sido propostas. Tulloch rejeitou três espécies descritas por Sorokin (1883), tal como definidas de acordo com a morfologia dos órgãos de hifas formadas dentro da hemocele de seus hospedeiros de insetos respectivos. No final Tulloch (1976) rejeitou a maioria dos nomes publicados e reduziu o gênero a duas espécies (*M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus*[J.R. Johnst.] M.C. Tulloch 1976) (BISCHOFF, 2009).

Driver et al. (2000) em um dos mais abrangentes estudos de filogenética e análise molecular até a data e, por meio de técnicas moleculares de sequenciamento das regiões

ITS e 28S rDNA D3 e do RAPD, seguiram o exemplo de Tulloch (1976), reconhecendo e confirmando as espécies de *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, além de *M. álbum* Petch, ressaltando a predominância do *M. anisopliae*. No entanto foram reconhecidos quatro agrupamentos, dois compostos por *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus* e outros dois que foram descritos como novas variedades, baseado nas suas distintas sequências ITS, compostos por *M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum* var. *nov.* O terceiro agrupamento representou duas novas variedades, *M. flavoviride* var. *novazealandicum* e *M. flavoviride* var. *pemphigum* var. *nov.* também baseado nas suas sequências ITS.

Huang et al (2005a) abordou a taxonomia e as relações de vários táxons da China que não foram incluídos por Driver et al (2000). Sendo assim, *Metarhizium guizhouense*, *M. taii* e *M. pingshaense* foram sinonimizados com *M. anisopliae*. Os resultados relatados por Driver et al (2000) e Huang et al (2005a, b) por si só são de uso limitado para resolver a história filogenética do *Metarhizium* (BISCHOFF, 2009).

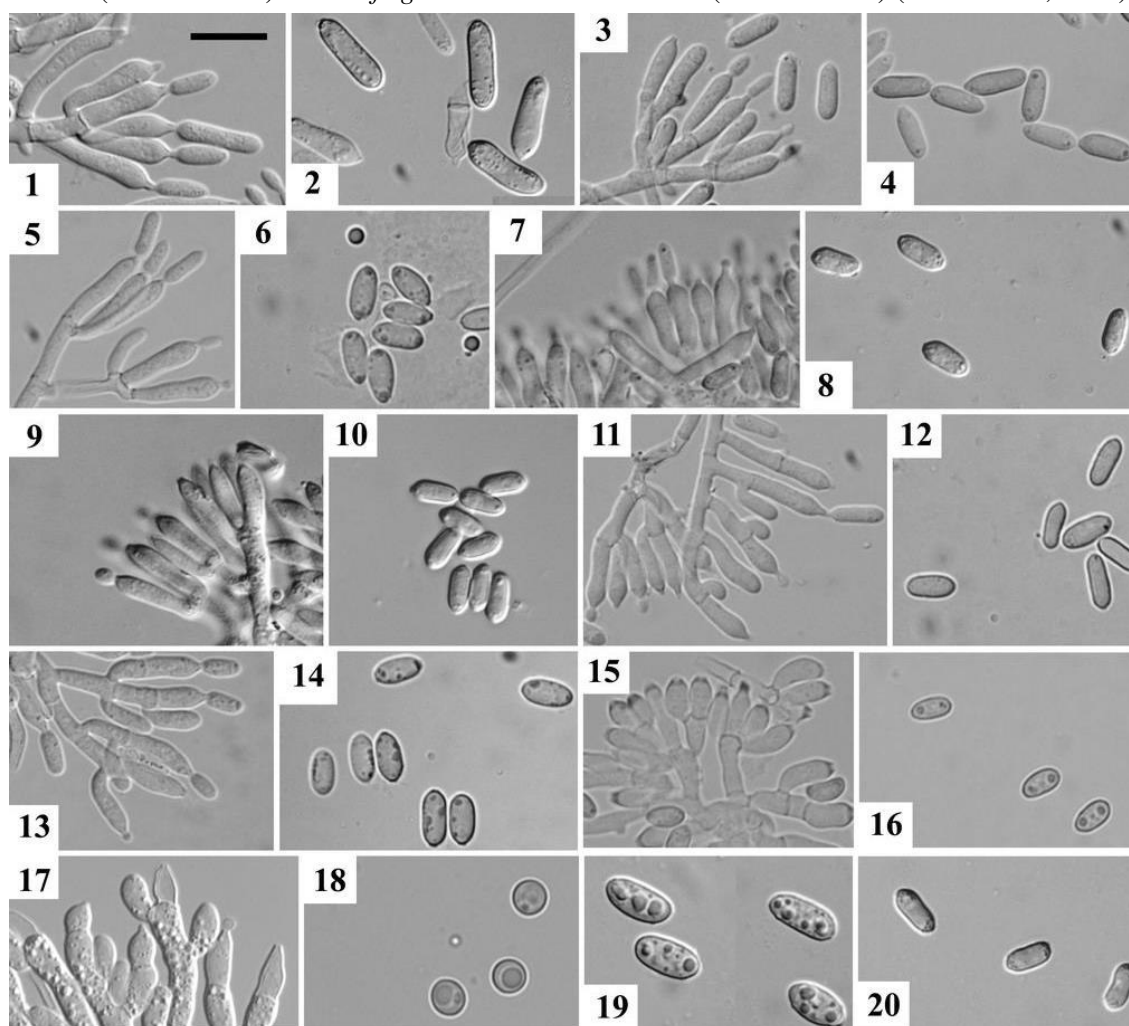
A taxonomia de *Metarhizium* e particularmente a espécie *Metarhizium anisopliae* tem sido investigada através das aplicações morfológicas, bioquímicas e características genéticas (por exemplo, DRIVER et al, 2000; TULLOCH, 1976). No entanto, taxonomias propostas foram incompletas e parcialmente incoerentes. Em um estudo recente, Bischoff et al (2009) apresentaram uma revisão taxonômica do complexo de espécies críticas de *M. anisopliae* com base em uma análise filogenética multilocus com ITS e EF1- α , que discrimina nove espécies, conforme a Figura 1.

Seis dessas espécies são incluídas em uma grande clade, referida como clade *Metarhizium* 1, composta por *Metarhizium majus*, *Metarhizium guizhouense*, *Metarhizium pingshaense*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii brunneum*. *Metarhizium lepidiotae*, *Metarhizium acridum* e *Metarhizium globosum* anteriormente incluídos no complexo de espécies crípticas de *M. anisopliae* têm sido reconhecidas como espécies distintas de agrupamento separadamente de *Metarhizium* 1 (SCHNEIDER et al 2011).

Liang et al (1991) foram os primeiros a confirmar a conexão de *Metarhizium* considerado assexuado, para o gênero *Cordyceps* teleomorfo Link (Fr.) (Clavicipitaceae, Hypocreales). Eles descreveram *C. taii* Z.Q. Liang & Liu e ligou-o a sua espécie recém-descrita anamorfo, *M. taii* Liang & Liu. Este nível de conexão do gênero anamorfo-teleomorfo foi fundamentada ainda mais quando Liu et al. (2001) descreveram um *Metarhizium* anamorfo para *C. brittlebankisoides* Zuo Y. Liu, ZQ Liang, Whalley, Y. Yao

J. & A.Y. Liu. Esta ligação tem sido apoiada subsequente por estudos filogenéticos moleculares (LIU et al., 2002, HUANG et al., 2005a). Os estados sexuais de espécies *Metarhizium* foram transferidos de *Cordyceps* para *Metacordyceps* (SUNG et al., 2007).

Figura 1. Conidiogênese e conídios maduros de espécies *Metarhizium*. Bar = 10 mM. 1-2. *Metarhizium majus* (ARSEF 1914). 1. Fiálides com o desenvolvimento de conídios. 2. Conídios maduros. 3-4. *M. guizhouense*. 3. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 7507). 4. Conídios maduros (ARSEF 6238). 5-6. *M. pingshaense*. 5. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 4342). 6. Conídios maduros (ARSEF CBS 257,90). 7-8. *M. anisopliae*. 7. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 7487). 8. Conídios maduros (ARSEF 7487). 10-09. *M. robertsii*. 9. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 727). 10. Conídios maduros (ARSEF 727). 11-12. *M. brunneum*. 11. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 4179). 12. Conídios maduros (ARSEF 2107). 13-14. *M. lepidiotae*. 13. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 4628). 14. Conídios maduros (ARSEF 7412). 15-16. *M. acridum*. 15. Fiálides (ARSEF 6592), observe que ápices das células na conidiogênese engrossam com a produção sucessiva de conídios. 16. Conídios maduros (ARSEF 5736). 17-18. *M. globosum*. 17. Fiálides (ARSEF 596). 18. Conídios maduros (ARSEF 2596). 19. *M. flavoviride*. Conídios maduros (ARSEF 2025). 20. *M. frigidum*. Conídios maduros (ARSEF 4124) (BISCHOFF, 2009).



3.3.2 Morfologia e Ciclo de Vida *Metarhizium anisopliae*

Os conídios de *Metarhizium anisopliae* são normalmente uninucleados, cilíndricos, normalmente mais estreitos no meio, hialinos ou fracamente coloridos e se formam sobre conidióforos simples que, justapostos, resultam em uma massa regular sobre o inseto (mononematosa). Os conídios podem se formar sobre ramificações compostas de um conjunto de micélio (sinema). As fiálides clavadas ou cilíndricas são originárias do vértice de hifas e se colocam uma ao lado da outra. A massa estromática é composta de um agrupamento de conídios em cadeias que dão origem a estruturas prismáticas compostas (ALVES, 1998). A espécie *M. anisopliae* possui duas variedades: *M. anisopliae* var. *majus* com conídios medindo entre 10 e 14µm e var. *anisopliae* com conídios de 5 a 8 µm.

M. flavoviride possui fiálides estreitas com cadeias de conídios ovóides e elípticos, os quais são normalmente verdes, e também possuem duas variedades de acordo com o tamanho de seus conídios: *M. flavoviride* var. *flavoviride* com conídios de 6 a 11 x 3 a 5µm e var. *majus* com 4 a 7 x 2 a 3 µm. A espécie *M. album* apresenta fiálides em forma de chave com conídios ovóides e elípticos de cor branca a marrom (CURRAN et al., 1994).

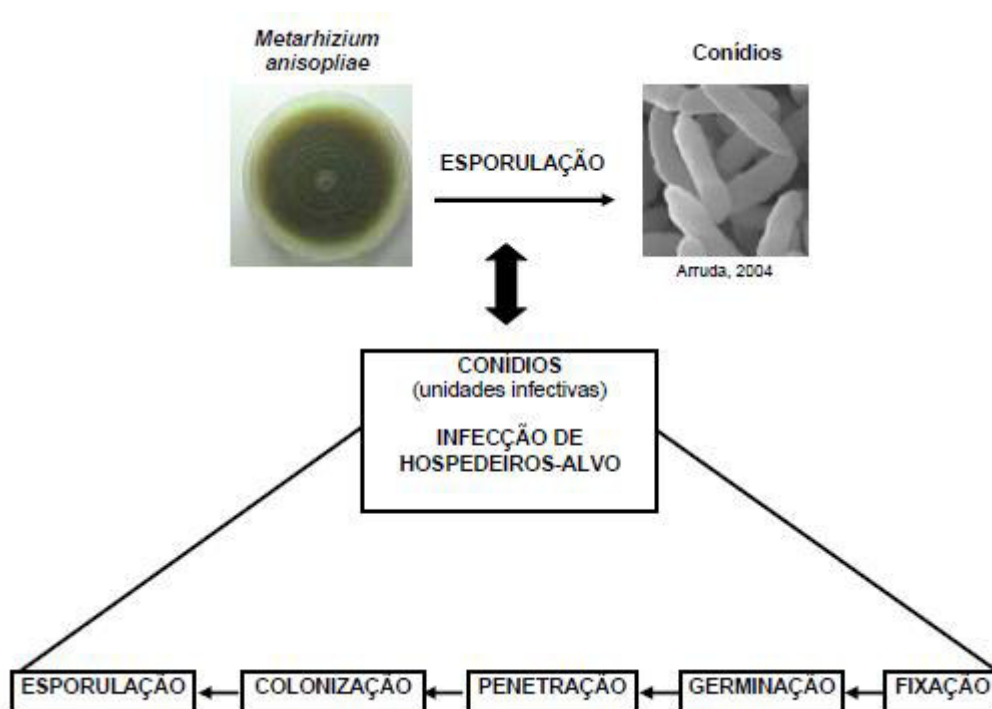
São reconhecidas duas formas de reprodução do *Metarhizium*: a reprodução assexual, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo e a reprodução parassexual, que envolve os fenômenos de heterocariose e de recombinação mitótica. O desenvolvimento vegetativo de *Metarhizium* ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, sendo a temperatura ideal entre 24 e 30°C e pH ótimo de 6,9 (DRIVER et al., 2000; ARRUDA, 2005). Uma alta variabilidade na termotolerância foi observada entre isolados de *M. anisopliae*, quando as suspensões de conídios foram expostas a baixas e altas temperaturas. Isolados de *Metarhizium* foram termotolerantes a temperaturas de 40 e 45°C (RANGEL et al. 2005; FERNANDES et al. 2008).

Este fungo apresenta processo de heterocariose, o qual foi descrito por Tinline & Noviello (1971), sendo que o processo parassexual completo, com obtenção de diplóides e segregantes descrito por Messias & Azevedo (1980). Silveira (1983) obteve protoplastos de *M. anisopliae* e fusão de protoplastos de mutantes morfológicos e auxotróficos.

M. anisopliae é um fungo de cultivo simples, necessitando quase que exclusivamente de uma fonte nutricional à base de amido; é cosmopolita e sem dúvidas é um dos fungos mais estudados em programas de manejo de pragas, uma vez que representa grande potencialidade como entomopatógeno (ONOFRE, 2002).

O ciclo de vida do *M. anisopliae* está apresentado na Figura 2 sendo bastante simples: por reprodução assexuada produz conidiósporos, que são as unidades infectivas; estes, quando liberados no ambiente, aderem à superfície do hospedeiro e germinam dentro de 16 a 20h quando em condições favoráveis. Posteriormente, na superfície do hospedeiro, a hifa desenvolve uma estrutura especializada denominada de apressório, a qual se fixa na cutícula e forma um grampo de penetração responsável pela secreção de enzimas hidrolíticas e pressão mecânica, fundamentais para a penetração ativa na cutícula do hospedeiro (BIDOCHKA et al., 1997; LOMER et al., 2001). Atingindo a cavidade corporal do hospedeiro, o fungo produz hifas que, após infestação massiva, emergem para superfície produzindo novamente conidiósporos (CURRAN et al., 1994).

Figura 2. Ciclo biológico do fungo *Metarhizium anisopliae*



3.4 *Cotesia flavipes*

Cotesia flavipes (Cameron) é um endoparasitóide larval gregário de *Chilo* spp. e outros gêneros de Crambidae, brocas de colmos de gramíneas do sudeste da Ásia e da Austrália. Os parasitoides larvais da broca são os mais utilizados como método de controle no Brasil e no mundo, especialmente o braconídeo *Cotesia flavipes* (Cameron), pois insere seus ovos no hospedeiro através de seu ovopositor (PINTO et al. 2006). Foi introduzido e estabeleceu-se em Maurício para o controle de *Proceras calamistis* (Hampson) (MOUTIA

& COURTOIS, 1952) e, de lá, foi levado para Madagascar, em 1955, onde também se estabeleceu (BETBEDER-MATIBET e MALINGE, 1967). Relatos anteriores de sua distribuição e lista de hospedeiros na Ásia são vistos com reserva por causa de confusões com a espécie próxima *Apantales chilonis* Munakata, que teve sua taxonomia esclarecida em 1965 (WATANABE, 1965).

Uma primeira tentativa de introduzir *C. flavipes* no Caribe, procedente de Maurício, fracassou (BENNETT, 1965). A primeira introdução bem-sucedida desse braconídeo nas Américas ocorreu no início dos anos 60, quando experimentos de laboratório na Flórida, EUA, foram seguidos por liberações de 30.000 adultos nos Everglades, em 1963. Depois de algumas recuperações, o inseto desapareceu, para reaparecer anos depois, vindo a tornar-se o parasitóide dominante, co-existindo com o braconídeo *Agathis stigmatera* (Cresson).

Introduções procedentes de Maurício e da Índia para Trinidad e para Barbados em 1966 resultaram em seu estabelecimento permanente, sobre *D. saccharalis*, a partir de 1967 nessas ilhas. Foi introduzido em Guadalupe em 1969 e 1979 procedente de Barbados e de Reunião, na Colômbia em 1970-1975 a partir de Trinidad, na Venezuela em 1975 a partir de Trinidad-Tobago e no Panamá em 1978-1980 também de Trinidad.

No Brasil, as primeiras tentativas de introdução foram feitas pela Copersucar e pelo Departamento de Entomologia da Esalq/USP em 1971, porém ficaram restritas a observações de laboratório e poucas liberações isoladas, nenhuma recuperação em lavoura de cana-de-açúcar foi mencionada (TERÁN, 1975; GALLO, 1977). Dificuldades nas criações em laboratórios foram os principais obstáculos que justificaram a interrupção das atividades com esse parasitoide.

Em abril de 1974, *C. flavipes* proveniente de Trinidad foi introduzida em Alagoas, iniciando-se então a participação desse parasitóide no Programa Nacional de Controle Biológico de *Diatraea spp.* no Brasil, desenvolvido pelo IAA/Planasucar (MENDONÇA FILHO; COSTA; RISCO, 1976). Durante o período de 1974 a 1976, *C. flavipes* foi introduzido em Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe, Bahia e Rio de Janeiro para controlar *D. saccharalis* e *Diatraea flavipenella* e em São Paulo e Amapá para controlar *D. saccharalis*. (MACEDO; BOTELHO; MENDES, 1977). Em 1975 iniciaram-se as pesquisas com *C. flavipes*, a partir de material procedente do nordeste do Brasil. Até 1978 o aperfeiçoamento na tecnologia tornou a produção de *C. flavipes* em laboratório mais simples e a melhoria de sua performance no campo deu-se com a introdução de novas

linhagens originárias de regiões mais frias e úmidas da Índia e do Paquistão, realizadas em 1978 (MACEDO, 1978).

Em 1991, 17 laboratórios de usinas cooperadas haviam liberado 943 milhões de adultos de *C. flavipes*, representando 76,8% do contingente de parasitoides liberados, e que a porcentagem de intensidade de infestação da praga, em canaviais de 26 usinas cooperadas, tinha sido reduzida de uma média superior a 9% em 1980 para 3,17% em 1991 (COPERSUCAR 1992).

Classificação taxonômica:

REINO: Animal

FILO: Arthropoda

CLASSE: Insecta

SUB-CLASSE: Pterygota

ORDEM: Hymenoptera

SUPER FAMÍLIA: Ichneumonoidea

FAMÍLIA: Braconidae

SUB-FAMILIA: Microgastrinae

GÊNERO: *Cotesia*

ESPÉCIE: *Cotesia flavipes*

O sucesso do parasitoide está estritamente relacionado aos mecanismos de interação hospedeiro-parasitoide, que se desenvolve ao longo do processo evolucionário e que permite a regulação da fisiologia do hospedeiro para o benefício do parasitoide (PINTO et al. 2006).

3.5 Compatibilidade de Agentes de Controle Biológico

Parasitoides e entomopatógenos podem ser utilizados simultaneamente em programas de manejo integrado de pragas, sendo necessário verificar a compatibilidade entre eles. A interação entre entomopatógenos e outros inimigos naturais que atuam sobre espécies de pragas é de grande importância quando se busca o emprego do manejo integrado de pragas (MIP), priorizando os agentes de controle biológico. Além disso, MIP tem sido promovido como uma combinação de técnicas sem dar a devida consideração a compatibilidade de cada componente.

Os biopesticidas poderiam desempenhar um papel crucial nas estratégias de MIP, embora eles representem apenas cerca de 4 % do mercado global de pesticidas.

Biopesticidas têm alta compatibilidade com outras técnicas de manejo de pragas, como inimigos naturais, variedades resistentes, produtos fitossanitários, etc. A integração de biopesticidas poderia melhorar o desempenho de estratégias de MIP (SRINIVASAN, 2012). No entanto, a aplicação conjunta de distintos agentes de controle biológico exige cuidados quanto a compatibilidade entre os organismos. Dessa forma, a compatibilidade entre os agentes de controle biológico deve ser avaliada para determinar os possíveis efeitos das interações negativas entre os organismos para aumentar a eficiência do Manejo Integrado de Pragas, como por exemplo a ação antagônica, podem culminar em perda de um ou mais dos organismos inoculados e inviabilizar o manejo (GUIMARÃES et al., 2013).

A ação dos patógenos competindo com parasitoides e predadores pode reduzir a eficiência de ambos, e dificultar a introdução do patógeno. Folegatti (1987), em experimentos utilizando *M. anisopliae* com *Apanteles flavipes* (Cam.), *L. minense* e *B. claripalpis*, observou que a aplicação conjunta do fungo com os parasitoides de *D. saccharalis* foi mais eficiente que a aplicação do fungo isoladamente e também que *M. anisopliae* não afetou o desenvolvimento de larvas dos parasitoides. *Telenomus podisi* e *Metarhizium anisopliae* são agentes de controle biológico que ocorrem ou podem ser utilizados conjuntamente. Entretanto, estudos de compatibilidade entre parasitoides e fungos entomopatogênicos são escassos. Os resultados obtidos por AGÜERO (2014) indicam que mesmo com as aplicações de *M. anisopliae*, o parasitismo e a viabilidade foram superiores a 70%, mostrando que o fungo é seletivo aos adultos de *T. podisi*, sendo classificado como inócuo (classe 1), de acordo com a IOBC (International Organisation for Biological and Integrated Control), e portanto, ambos os agentes de controle biológico podem ser utilizados conjuntamente no Manejo Integrado de Pragas, espaçando-se ao máximo as aplicações do fungo e liberações do parasitóide para conseguir maior eficiência (AGÜERO, 2014). Em estudos de interação de *M. anisopliae* e *Trichogramma galloi* realizados por Broglio - Micheletti et al (2006) a cepa IPA 139E de *M. anisopliae* não reduziu parasitismo de ovos de *D. saccharalis* por *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*), o que demonstra a segurança deste fungo entomopatogênico a este parasitóide. A alta mortalidade de *C. flavipes* em 72 h no controle e nos tratamentos com os entomopatógenos não pode reduzir o parasitismo por *C. flavipes*, cujo adultos começam a parasitar seus hospedeiros cerca de 24 h após a emergência (SIMÕES et al . 2012). Isto sugere que os métodos de 2 agentes de controle biológico podem atuar sinergicamente na gestão de *D. saccharalis* em canaviais.

Fungos entomopatogênicos e *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) são usados em culturas de cana de açúcar. Fungos entomopatogênicos como o *M. anisopliae* podem causar impacto em parasitóides benéficos e em outros insetos não-alvo (ROY & COTTRELL, 2008) sinergicamente ou antagonicamente (FUENTES-CONTRERAS & NIEMEYER 2000; STOLZ et al., 2002; DELPUECH & DELAHAYE 2013). Em campos de cana no Brasil *M. anisopliae* é aplicado para controlar *Mahanarva fimbriolata* e *B. bassiana* é aplicada contra cupins, *Metamasius hemipterus* (Coleoptera : Curculionidae), broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). Estes tratamentos tipicamente ocorrem após liberações de *C. flavipes* para controlar *D. Saccharalis*. Dela Rosa et al. (2001) ressaltam que *B. bassiana* e *M. anisopliae* já foram isolados de diversas espécies de microhimenópteros parasitóides, enfatizando a necessidade de avaliar os possíveis efeitos negativos dos fungos entomopatogênicos sobre estes inimigos naturais. Assim interações parasitóide - entomopatógeno - hospedeiro em sistemas agrícolas pode ser prejudicial para populações de artrópodes e comunidades ecológicas (MEYLING et al., 2009; MEYLING et al., . 2011).

Claramente é importante saber os padrões de mortalidade e as interações entre fungos e inimigos naturais envolvidos no MIP (SANTOS et al. 2006). Em alguns casos, a infecção subletal causada por fungos entomopatogênicos pode resultar em menor atividade dos insetos. Parasitóides tratados com *Paecilomyces fumosoroseus* foram significativamente menos ativos do que parasitóides não tratados para a porcentagem de tempo, velocidade e distância percorrida (LACEY et al ., 1996). A compatibilidade de agentes de controle biológicos podem ser afetadas pela presença de competição interespecífica No entanto, pouca atenção tem sido dada às interações indiretas em que uma espécie não- alvo é afetada pelo agente de controle biológico sem sofrer ataque direto. A falta de evidência experimental sobre este tema pode ser o resultado de dificuldades em documentar essas interações (MESSING et al ., 2006).

Outro aspecto a ser levado em consideração quando se trata de compatibilidade de agentes de controle biológico é que os fungos são diretamente prejudicados por agroquímicos que também são utilizados nos programas de MIP, o que compromete o manejo integrado de pragas, pois esses produtos podem causar a inibição do crescimento vegetativo, da produção e inviabilidade de conídios e esporos, além da sua patogenicidade e virulência (CAVALCANTI et al., 2002). O controle integrado, com a utilização de produtos fitossanitários seletivos desde inseticidas, herbicidas e fungicidas em conjunto

com os fungos entomopatogênicos ou outros agentes de controle biológico, pode ser uma estratégia segura e eficiente (LOUREIRO et. al., 2002). Assim, a busca por produtos químicos mais seletivos para a utilização no controle de pragas é necessária para não eliminar ou diminuir a ação dos inimigos naturais, ou até mesmo promover uma interação sinérgica quando utilizados juntos, associando a ação do químico com os microrganismos entomopatogênicos, contribuindo assim, para um maior controle da praga (CAVALCANTI et al., 2002).

Assim, práticas como a utilização correta de produtos químicos, com a verificação da seletividade dos produtos aos microrganismos; a compatibilidade de entomopatógenos com outros agentes biológicos (predadores, parasitóides, por exemplo); a utilização de práticas agrícolas visando a melhoria da ação dos entomopatógenos (irrigação, plantio direto); a incorporação de patógenos em plantas (transformação genética) e o manejo da resistência de pragas aos entomopatógenos, que deve ser preocupação constante, são essenciais para a inclusão dos microrganismos patogênicos a insetos num sistema equilibrado, eficiente e sustentável.

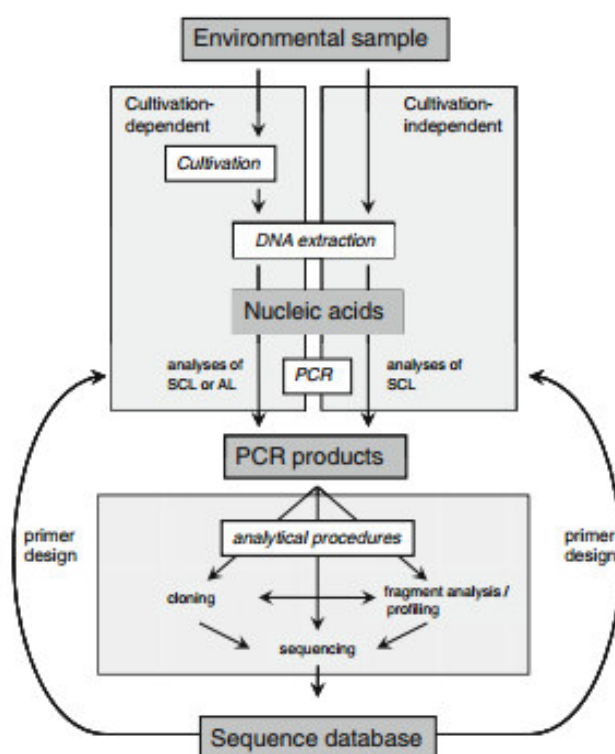
3.5 Identidade Genética de Fungos Entomopatogênicos

A Identidade Genética de microrganismos, a capacidade de os identificar ao nível da espécie, e de discriminar entre indivíduos da mesma espécie conheceu grandes avanços nos últimos anos, tendo sido alavancada por uma série de novos métodos que fazem uso da grande variação encontrada no DNA destes microrganismos. O desenvolvimento de técnicas moleculares de identidade genética de microrganismos, abriu novas possibilidades nos campos da classificação, identificação e diagnóstico. O conhecimento sobre a filogenia e evolução dos microrganismos foi também grandemente ampliado. Qualquer método de identificação genética deve permitir a diferenciação clara de estirpes, e principalmente, deve ter uma elevada reprodutibilidade. Nem todos os métodos moleculares de identificação são igualmente eficazes, diferindo nomeadamente na capacidade discriminatória em diferentes níveis taxonômicos. Como tal, a escolha do método a ser aplicado deve ser feita de acordo com a finalidade pretendida (por exemplo identificação e diferenciação), entre outros aspectos, (reprodutibilidade, poder discriminatório, custos envolvidos, etc).

Uma vez que a invenção da reação em cadeia da polimerase (PCR), os diferentes métodos de impressão digital de DNA (fingerprinting) tem sido descrito como útil para

distinguir isolados fúngicos específicos e sua identidade genética. A Figura 3 ilustra num fluxograma os passos analíticos utilizados em PCR e análises moleculares (AMANN et al., 1995).

Figura 3. Fluxograma que ilustra os princípios para a análise de amostras ambientais utilizando técnicas moleculares baseadas em PCR. Análises de cultivo dependentes - e de cultivo independente são destacados em caixas cinza claro e procedimentos analíticos são indicados por uma caixa sombreada. Os pormenores são descritos no texto.



Fonte: ENKERLI & WIDMER, 2010 p. 18.

Desenvolvimento de métodos moleculares tem melhorado muito a capacidade de detectar rapidamente, identificar e classificar os microorganismos e também estabelecer a relação taxonômica entre gêneros e espécies estreitamente relacionadas. Identificação, utilizando métodos moleculares, baseia-se na comparação entre as sequências de ácidos nucleicos (DNA, RNA) ou perfis de proteínas de um microorganismo com dados documentados em organismos conhecidos. Este último composto por comparações de sequências de regiões genômicas conservadas, tais como 16S ou 18S de RNAr, ou comparações de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism), polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado (AFLP- Amplified Fragment Length Polymorphism) ou % de G + C elevada no conteúdo do DNA genômico com os dados correspondentes em organismos

conhecidos. Identificação genotípica confiável requer bancos de dados com informações precisas e completas a partir de um grande número de sequência e táxons. As bases de dados de sequências de genes vulgarmente utilizados incluem (CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, 2015):

GenBank®Referência 1;

Ribosomal Projeto de Banco de Dados (RDP) Referência 2;

Coleção da Europa de dados de sequências de nucleótidos (EMBL) de Referência 3; e

Proteína de Recursos Universal (UniProt) Referência 4.

A caracterização e tipagem molecular são usadas para distinguir os indivíduos de interesse como variações ou polimorfismos no DNA. O polimorfismo pode ocorrer principalmente por dois tipos de mudanças: mudanças nas bases nitrogenadas por adição, translocação de transição, ou de eliminação, mutações e rearranjos na sequência do DNA (VALADEZ & KAHL, 2000, ROBLES et al., 2004). Essas mudanças são normalmente localizadas em uma região específica na molécula de DNA. O polimorfismo de indivíduos geneticamente relacionados pode ser revelado através de ferramentas úteis como marcadores moleculares. Por isso, os marcadores de DNA se prestam para estudos de genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética, também, as marcas de DNA podem ser usadas para impressões digitais do DNA (fingerprinting) (LOPES et al., 2015).

Idealmente, dados quantitativos de DNA fingerprinting com marcadores estáveis apropriados de vários isolados de uma espécie devem ser armazenados em um banco de dados. Os perfis de fingerprint podem ser usados como padrão de referência entre diferentes laboratórios para identificação de incógnitas ou novas estirpes. Banco de dados podem ser também combinados com estudos atuais de sistemática para localização de espécies, especialmente com espécies complexas conhecidas como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *L. lecanii* (HUMBER, 1997). Embora dados de sequências de DNA poderiam fornecer um banco de dados mais estável, sequenciamento de numerosos isolados para identificação de cepas, podem não ser prática para muitos laboratórios. Dados de “DNA fingerprinting” são significativos apenas com adequadas análises quantitativas e interpretação bem informada.

Quando o principal objetivo de um estudo é identificação de um isolado ou espécie específica (por exemplo, para rastrear o estabelecimento ou dispersão de um agente de controle biológico em uma área) primers específicos em combinação com protocolos de ensaios sensíveis, precisam ser projetados para detecção e diagnóstico. Estes primers são baseados em conhecimento prévio de sequências de DNA alvo e pode ser detectado genes

específicos (por exemplo DNAr ou genes de patogenicidade) ou sequências únicas podem ser geradas a partir de DNA fingerprint por primers arbitrários (AP-PCR - application of polymerase chain reaction with arbitrary primer) ou AFLP. Um exemplo mais recente é a região amplificada de sequência caracterizada (SCAR- Sequence Characterized Amplified Regions) marcadores baseados em sequências únicas para uma cepa ou espécie detectado pelo uso de primers arbitrário de PCR - AP-PCR (PARAN and MICHELMORE, 1993). Esta estratégia tem sido utilizada para desenvolver SCAR primers para detecção de *B. bassiana* isolado GHA, o ingrediente ativo é comercialmente avaliado nos EUA, em amostras do meio ambiente para estudos de eficácia e persistência de campo (CASTRILLO et al., 2003). A vantagem desses marcadores específicos é que eles permitem a detecção de isolados/espécies alvos de uma mistura de amostras do meio ambiente, especialmente onde outros isolados nativos ou espécies intimamente relacionadas podem estar presentes (CASTRILLO et al., 2007).

Há várias técnicas disponíveis, cada uma utilizando uma estratégia particular para detectar a identidade genética dos isolados. O método generalizado de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA) tem sido utilizada em muitos estudos. A técnica de RAPD é baseada em primers curtos (6-12 bases) que se anelam em regiões não específicas no DNA molde. Não é necessário ter qualquer conhecimento prévio sobre o DNA do organismo, mas culturas puras são necessárias. Esta técnica pode obter fragmentos que diferem em tamanho e sequência de nucleotídeos, devido à existência de polimorfismo nas amostras moldes de DNA, e são geralmente dominantes (VALADEZ & KAHL, 2000). No entanto, o método sofre de falta de reprodutibilidade entre os laboratórios (GLARE, 2004) e não é possível comparar as impressões digitais entre os estudos. Outro método comparável, universalmente preparado (UP-PCR - universally primed-PCR) é baseado em primers mais gerais e uma maior temperatura de anelamento, que o torna mais robusto em termos de reprodutibilidade (BULAT et al., 1998; BULAT et al, 2000). UP-PCR tem sido usado para separar os isolados simpátricos de *Beauveria* na Dinamarca e foi utilizado para colocar os isolados em grupos genéticos (MEYLING & EILENBERG, 2007).

Métodos específicos visam caracterizar alvos selecionados no DNA do organismo, fornecendo ferramentas para a comparação explícita entre isolados e os estudos (MEYLING, 2008). Um método comumente utilizado é a digestão dos produtos de PCR de regiões específicas do DNA, tais como genes ou espaçador transcrito interno (ITS - Internal. Transcribed Spacer), com enzimas de restrição, gerando fragmentos de tamanhos

variáveis que podem ser separados em um gel de agarose. Estes PCR-RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) têm sido usados para a caracterização de espécies de *Beauveria* e *Metarhizium* (BIDOCHKA et al., 2001). Embora o método seja específico, reprodutível e explícito, o resultado do tamanho do fragmento é feito principalmente a partir de fotos de gel e isso tem alguma subjectividade a ele. Além disso, apenas algumas variáveis são obtidas a partir de uma única enzima de restrição, assim, várias dessas deve ser utilizada para cada região alvo, para aumentar a variabilidade (MEYLING, 2008).

Mais variáveis podem ser obtidas com o método de AFLP. Este método baseia-se na digestão inicial do DNA genômico inteiro com enzimas de restrição em fragmentos de tamanhos variáveis. Adaptadores específicos são então anexados ao terminal, e os fragmentos são amplificados por PCR com pares de primers que se anelam aos adaptadores. Os tamanhos de fragmentos podem ser marcados em gel de poliacrilamida ou se eles são rotulados com marcas fluorescentes, podem ser dimensionados de forma mais objetiva, em um seqüenciador de capilar. Este método de impressão digital é mais reprodutível e foi recentemente utilizado para caracterizar genótipos de *B.bassiana* e *M.anisopliae* (DE MURO et al., 2003; INGLIS et al., 2008; DE MURO et al, 2005).

Populações clonais de *B.bassiana* no Quênia foram analisadas por AFLP sendo a técnica eficiente na diferenciação entre isolados de *B. brongniartii* e *B. bassiana*, demonstrando ser sensível para identificação de variabilidade interespecífica de isolados (DE MURO et al., 2003). Além disso, a análise AFLP indicou presença de variabilidade intra-específica em *B.bassiana* e a formação de alguns grupos associados com a região geográfica de origem dos isolados (DE MURO et al., 2005).

Outro marcador molecular amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies é o DNA ribossomal (DNAr). Os DNAr nos eucariotos estão presentes repetidas vezes e cada unidade consiste de regiões codificadas para os genes RNAr 18S, 5.8S e 28S, e dois espaços internos (ITS1 e ITS2) que separam essas regiões. Cada unidade de DNAr é separa por um espaço intergênico (IGS). A unidade de DNAr apresenta componentes em sua sequência que envolve variações e podem ser usadas em estudos de sistemática para diferentes níveis taxômicos (FOULY et al.,1997).

As regiões DNAr 18S e 28S são muito conservadas e podem ser utilizadas para diferenciação em níveis de gênero e espécie (BERBEE & TAYLOR, 1995; GARGAS & DEPRIEST, 1996). Por outro lado, estas regiões não contém variabilidade suficiente para a delimitação interespecífica ou inter-gênero que muitos estudos estão focando (S.A. REHNER, pers. comm.). Recentemente conjuntos de primers que amplificam regiões

selecionadas nos genomas de *Beauveria* e *Metarhizium* já foram desenvolvidos, possibilitando a criação de ferramentas úteis para uma explícita caracterização dos isolados. Regiões para as quais sequências de primers foram publicadas incluem fator de alongação EF1- α (REHNER & BUCKLEY, 2005) e Bloc (REHNER et al., 2006). Estas regiões estão começando a ser empregadas em estudos de *Beauveria spp* (GLARE et al, 2008; REAY et al, 2008).

Tais técnicas moleculares estão cada vez mais sendo aplicadas para a detecção e genotipagem de fungos em amostras ambientais. Fournier et al. (2008) estabeleceu uma ferramenta baseada em PCR para a detecção específica e quantificação de *Pandora neoaphidis* no ambiente, Schwarzenbach et al. (2009) aplicaram seis sequências de repetição simples Microssatélites (SSR - Simple Sequence Repeats) como marcadores para detectar e quantificar *Beauveria brongniartii* no solo, e Castrillo et al. (2007) desenvolveram uma ferramenta de detecção molecular e quantificação para esporos de *Entomophaga maimaiga* no solo.

Para o gênero *Metarhizium* foram desenvolvidas ferramentas para a detecção baseado na PCR independente de cultivo (metagenômica) para *M. acridum* (ENTZ et al., 2005) e para duas linhagens de *M. anisopliae* (DE STEFANO et al., 2004). Além disso, 41 marcadores SSR estão disponíveis para a avaliação de *M. anisopliae* e da estrutura da população e identificação de cepas de *M. anisopliae* em amostras de ambiente (ENKERLI et al., 2005; OULEVEY et al., 2009).

Os microssatélites são abundantes e estão dispersos nos genomas eucariotos, em regiões codificadoras e não codificadoras; possuem herança codominante, o que discrimina homozigotos de heterozigotos; são multialélicos, altamente polimórficos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco entre todas as classes de marcadores moleculares e são detectáveis por meio de PCR. Além disso, são altamente reproduzíveis, não requerem radioatividade, os locos são frequentemente conservados entre espécies relacionadas, podendo ser compartilhados entre diferentes laboratórios (AZEVEDO, 2007). Bovi et al. (2014) utilizando oito SSR loci permitiu a detecção de 40 haplótipos na população *Metarhizium spp*, indicando alta diversidade genética e alta capacidade de marcadores SSRs para a identificação e rastreabilidade dos isolados em bio- inseticida.

Outro método amplamente utilizado relacionada com o sucesso do PCR é a predição de todos os produtos de PCR a partir da sequência do genoma. Este processo é conhecido como PCR eletrônico (e-PCR) ou PCR virtual (VPCR). PCR eletrônico foi inicialmente desenvolvido para detectar a presença de locais de sequências marcados

(STS) no molde de DNA (SCHULER, 1997). PCR Virtual é um serviço baseado na web que prevê produtos de PCR de diferentes genomas (LEXA et al., 2001). O uso de e-PCR na análise rápida, automática de sequências genômicas se tornará cada vez mais importante, pois a taxa de acumulação de dados continua a aumentar. Além do mais, a partir de sequências de um genoma com um par de primers específicos ou vários primers para determinadas regiões polimórficas ou conservadas é possível identificar rapidamente a sua espécie, ou seja, por meio de um processo de busca computacional em um banco de dados, conseqüentemente com muito mais confiança, por se tratar do genoma completo e uma busca eletrônica.

Algumas das limitações associadas a métodos genotípicos também incluem: dificuldades na diferenciação entre espécies que compartilham sequências região conservada idênticos e / ou semelhantes, informações limitadas sobre a qualidade dos dados de seqüência disponíveis em bases de dados públicas e da complexidade da nomenclatura taxonômica global. Considerando o exposto acima, é importante para a validação dos resultados de métodos de identificação com dados genotípicos microbianos a partir de outras fontes. O conhecimento da sensibilidade e especificidade de ferramentas genômicas e sua aplicação na identificação microbiana está evoluindo rapidamente. No entanto, os desafios relacionados à padronização de metodologias de genômica (incluindo otimização de protocolos e ferramentas de bioinformática para a anotação de dados confiáveis, interpretação, etc.) para uma espécie de microrganismo específica continuam a dificultar a sua aplicabilidade em segurança (risco) de avaliação e tomada de decisões regulatórias, pois cada espécie tem suas particularidades, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas específicas para uma espécie.

Para avaliar *Metarhizium anisopliae* como um agente de biocontrole, é importante investigar variações genéticas entre os isolados e suas capacidades de distribuição, persistência e o potencial de realizar permuta gênica dentro de uma mesma população e com outras populações, principalmente estabelecer sua identidade genética através de um conjunto de diferentes marcadores moleculares para diferentes regiões, garantindo assim uma análise mais complexa tanto a nível de espécie como de isolados. Esses dados não só complementaríamos informações biológicas fundamentais, mas também contribuiríamos em fazer cumprir as exigências para o registro de produtos biológicos. Além disso, esse tipo de investigação permite uma identificação pontual de isolados favorecendo o melhor monitoramento da persistência e do comportamento de um isolado introduzido no ambiente para finalidade de controle (WANG et al., 2005).

Com a modernização das técnicas moleculares e conseqüentemente seus custos mais baixos a tendência é utilizar a genômica, ou seja, o sequenciamento do genoma completo do fungo de interesse. A recente publicação de genomas de referência e genômica comparativa do *M. anisopliae* e do patógeno específico de gafanhotos, *M. acridum* reforçaram ainda mais a compreensão da biologia desses fungos entomopatogênicos e da base molecular da especificidade do hospedeiro, representando um recurso significativo para futuras pesquisas deste biopesticida fúngico de importância agrícola. A informação proveniente de estudos genômicos comparativos pode ser utilizada para identificar genes que podem contribuir para isolar a virulência e a aptidão física, bem como outras características que afetam a variabilidade da cultura e a estabilidade de potenciais biopesticidas (KLEPER et al., 2012; GAO et al., 2011). Além do mais, técnicas modernas e inovadoras como o e-PCR irão auxiliar na identificação de microrganismos pelo fato de poder explorar o genoma inteiro de um microrganismo de uma maneira mais rápida, confiável e com maior volume de dados de diversas regiões que poderão ser confrontados ao mesmo tempo em uma plataforma WEB por exemplo, sem ter a necessidade de se gastar tanto tempo utilizando um PCR convencional para cada região.

3.5.1 PCR eletrônico (e-PCR) como ferramenta de identificação

Um marco importante na história da construção do mapa do genoma humano foi a noção da existência de sítios de seqüências marcadas (STS), que é definido por um par de iniciadores de oligonucleotídeos que podem ser utilizados numa PCR para amplificar um lugar único dentro do genoma (OLSON et al., 1989). Marcadores STS formaram a base para praticamente todo mapeamento físico e genético construído ao longo da última década, rapidamente substituindo a geração anterior de marcadores de DNA de segmentos clonados. Pares de iniciadores de PCR também pode ser utilizado para analisar o transcriptoma, produzindo perfis em larga escala da expressão genética. Pelo fato de STSs serem definidos pela sua seqüência de primer -PCR, esses marcos do genoma podem ser recuperados nas seqüências de DNA por meio de uma estratégia computacional chamada 'PCR eletrônico' (e-PCR). Resumidamente, o procedimento envolve a procura de subsequências que combinam os dois iniciadores e, em seguida, exigindo que eles estejam na ordem, orientação e espaçamento corretos para dar produto de PCR com o peso molecular correto (SCHULER, 1997).

Segundo Schuler (1997) em alguns casos, o tamanho dos produtos de PCR amplificados pode ser polimórfico, o que permite a transmissão de variantes alélicas das famílias a serem estudadas. Esta propriedade é essencial para STSs usados em mapeamento genético, ao passo que nenhum STS pode ser utilizado para o mapeamento físico. A vantagem de STSs em relação a outros tipos de marcadores é que não existe qualquer requisito absoluto para manter e distribuir quaisquer materiais biológicos, ou seja, é possível determinar a localização de uma nova sequência sem a realização de uma única experiência no laboratório. Em vez disso, os marcadores podem ser armazenados em bases de dados informáticas e divulgados através de redes electrónicas. Isto é devido ao fato que é fácil e relativamente barato para sintetizar oligonucleotídeos, permitindo a qualquer laboratório em todo o mundo regenerar reagentes necessários de ensaio para um dado marcador. Além do mais, pode ser utilizado para encontrar qualquer região específica no genoma, basta seleccionar os primers específicos, podendo utilizar esta técnica para identificação virtual de espécies (MURPHY et al., 2004).

O processo de e-PCR é tipicamente realizada com a ajuda de software de alinhamento de sequências, que conta o número de correspondências idênticas ou quase idênticas entre o iniciador e o DNA molde. O programa BLAST é mais frequentemente utilizado para este fim em múltiplas aplicações (XU et al., 2002 e ROUCHKA et al., 2005). No entanto, a velocidade de BLAST não é suficiente para o e-PCR em grandes genomas eucarióticos com grande número de iniciadores. Métodos de alta velocidade aplicáveis a problemas de grande escala são cada vez mais importantes com o crescente número de sequências do genoma. A velocidade pode ser aumentada através da utilização megablast (ZHANG et al., 2000), BLAT (KENT, 2002) ou SSAHA (NING et al., 2001), que são especificamente concebidos para a sequência de pesquisa em grande escala e alinhamento. Um programa básico que implementa este processo foi desenvolvido (disponível em [ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub / schuler / e-PCR /](ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/schuler/e-PCR/)) e um recurso World Wide Web está disponível para a análise on-line e-PCR de sequências de DNA fornecido pelo usuário (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/STS/nph-sts>).

3.6 Plataformas de Identificação de Microrganismos

A fim de utilizar a mesma terminologia, o estabelecimento de um WebBased (banco de dados) para dados de sequência e revisões taxonômicas dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* está em curso no Micologia Systematic USDA-ARS e Laboratório de

Microbiologia, (Beltsville, MD). O esboço da plataforma foi apresentado no Workshop na reunião anual da Sociedade de Patologia de Invertebrados em Warwick, Reino Unido, em agosto de 2008 por Stephen Rehner. A intenção é de que o banco de dados, MBID (*Metarhizium-Beauveria* ID), vai criar base para uma plataforma de referência comum para todos os cientistas que trabalham com estes fungos. O banco de dados vai conter informações sobre as sequências de primer, sequências de referência dos isolados identificados que podem ser usadas para comparações, bem como a mais nova taxonomia dos fungos (MEYLING, 2008). Segundo Rehner et al., (2008) estão desenvolvendo um site acessível ao público, a ser hospedado no USDA-ARS, em Beltsville, MD, EUA, que fornece recursos de identificação de espécies padronizados para *Beauveria* e *Metarhizium*. O núcleo desse recurso é um banco de dados pesquisável, o BLAST, de registros de sequência para isolados selecionados e representativos da diversidade de espécies destes gêneros com base em revisões sistemáticas moleculares recentemente concluídas e em curso. Todos os isolados no banco de dados são “etiquetas” em coleções de culturas acessíveis ao público. Usuários poderão entrar com sequências e consultar para um dos vários locus filogeneticamente informativos que foram determinados para todas as espécies atualmente reconhecidos para *Metarhizium* e *Beauveria* (por exemplo, *Metarhizium*: EF-1alfa, RPB1 & 2, B-tubulina; *Beauveria*: ITS, EF-1alfa, Bloc). Descrições de primers preservados de PCR e sequenciamento para diagnóstico de todos os loci estará disponível. Será fornecido descrições de espécies morfológicas e moleculares completas com imagens, bem como chaves para a espécie. No futuro, o site será expandido para incluir gêneros adicionais de fungos entomopatogênicos, e atualizado com dados relativos a espécies novas e revistas serão publicadas (REHNER et al., 2008).

A Website *Fusarium* MLST do Centro CBS-KNAW Biodiversidade fúngica (<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium>), e o site correspondente Fusarium-ID hospedado na Universidade Estadual da Pensilvânia (<http://isolate.fusariumdb.org>; GEISER et al., 2004, PARK et al., 2010) foram construídos para facilitar a identificação de *Fusarium* de importância agrícola e clínica através da realização de consultas de nucleotídeos no BLAST, nesses bancos de dados de sequências de DNA via internet. Como um dos mais importantes patógenos de plantas, produtores de micotoxinas do mundo e patógenos oportunistas humanos emergentes (BALAJEE et al., 2009, GEISER et al., 2013), o gerenciamento de doenças e controle de infecção exigem que estes fungos economicamente destrutivos possam ser identificados com precisão e rapidez (WINGFIELD et al., 2012). No entanto, numerosos estudos filogenéticos moleculares ao

longo das últimas duas décadas estabeleceram que o reconhecimento da espécie morfológica falha com frequência (GCPSR sensu Taylor et al., 2000). Quando foi lançado em 2004 (GEISER et al., 2004), Fusarium-ID foi povoada inicialmente com seqüências do fator de alongamento da transcrição 1- α (TEF1), que podem ser usados para identificar a maioria, mas não todos os fusaria. Para suprir esta deficiência, um esforço concertado tem e continuará a ser feito para preencher o Fusarium-ID (PARK et al., 2010) e Fusarium MLST, bancos de dados com seqüências parciais de dois loci filogeneticamente informativos adicionais, RNA polimerase II maior (RPB1) e a segunda maior subunidade (RPB2). Trabalhos em curso são direcionados para preencher esses bancos de dados com porções destes três genes das 300 fusaria filogeneticamente distintas descobertos até hoje via GCPSR. Estes três fragmentos de genes podem ser amplificados por PCR e seqüenciado utilizando iniciadores que são conservados em toda a amplitude filogenética de *Fusarium* (O'DONNELL et al., 2010). Futuramente, outros genes ortólogos filogeneticamente informativos serão adicionadas a ambas as bases de dados que resolvem em ou perto do nível-espécies e pode ser usado em toda a amplitude filogenética de *Fusarium*. A filogenia robusta do gênero inferida a partir de dados de seqüências de RPB1 + RPB2 parciais resolveram 20 espécies complexas monofiléticas e nove linhagens monotípicas, que foram chamados informalmente para facilitar a comunicação de filiação de clade de um isolado e diversidade genética (O'DONNELL et al., 2013).

Existem outras plataformas de identificação de fungos menos específicas do que estas citadas acima, como o JGI Fungal Genomics Program, onde Genomas de fungos de energia e meio ambiente estão no foco do Programa Genômica de fungos do Departamento de Energia Joint Genome Institute (JGI). Seu projeto chave, o Genomics Encyclopedia de Fungo, tem como alvo fungos relacionados à fitossanidade (simbiontes, os agentes patógenos e controle biológico) e processos de biorefinaria (degradação da celulose, fermentação de açúcar, anfitriões industriais), e explora diversidade fúngica por meio de seqüenciamento e análise do genoma. Mais de 50 genomas fúngicos foram seqüenciados por JGI e os dados liberados através MycoCosm (www.jgi.doe.gov/fungi), um web-portal fúngico, que integra a seqüência e dados funcionais do genoma com ferramentas de análise para comunidade de usuários. Combinando as novas tecnologias de seqüenciamento e ferramentas de genômica comparativa, JGI é agora a líder mundial em seqüenciamento e análise de genoma fúngico. Mais de 120 genomas fúngicos seqüenciados com ferramentas de análise estão disponíveis via MycoCosm (www.jgi.doe.gov/fungi), um web-portal para biólogos microbiologistas. Nosso modelo de interagir com as comunidades de usuários

únicos, entre outros centros de sequenciamento, ajuda a organizar essas comunidades, melhora anotação e análise de trabalho de genomas, e facilita novos projetos de genômica de maior escala (GRIGORIEV, 2011).

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E DO TEMPO LETAL (TL₉₀) DE
ISOLADOS DE *Metarhizium spp.* SOBRE LAGARTAS DE *Diatraea*
saccharalis

1-INTRODUÇÃO

Com a degradação maciça dos ambientes naturais, o avanço de monoculturas agrícolas e a utilização indiscriminada de produtos fitossanitários químicos tóxicos ao meio ambiente estima-se que grande parte da diversidade de fungos entomopatogênicos, com potencial de utilização em programas de controle microbiano de pragas seja perdida.

O setor sucro-alcooleiro tem-se destacado pela rápida expansão das áreas de plantio da cana-de-açúcar, o que está levando as usinas e produtores de cana a buscarem novas técnicas de controle de pragas, dentre elas o controle biológico da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Os canaviais localizam-se em regiões quentes e com alta taxa de umidade. Nesse contexto, os fungos entomopatogênicos destacam-se no manejo integrado de pragas devido sua especificidade, seletividade, compatibilidade com outros métodos e segurança ambiental (PATERNIANI, 2001; ALMEIDA, 2007).

No entanto, para o desenvolvimento de um programa de controle microbiano a seleção de isolados de fungos entomopatogênicos é de extrema importância e deve ser a etapa inicial. A grande variabilidade genética dos fungos deve ser explorada para que sejam utilizados isolados mais adaptados ao inseto e conseqüentemente mais virulentos (ALVES, 1998). Dada sua importância, diversos e variados trabalhos de seleção de isolados de fungos entomopatogênicos estão descritos em literatura. Em todos os testes de seleção foi observado que a eficiência dos isolados variou, provocando mortalidades entre 10 e 95% aos insetos testados. Para a biofabricação de um bioproduto, a base de fungos entomopatogênicos é essencial que se faça uma seleção de isolados fúngicos considerando algumas características fundamentais para o desenvolvimento do produto, como por exemplo, seleção de isolados agressivos à praga alvo e com alta capacidade de produzir esporos de cada isolado, pois, na maioria das vezes, o isolado apresenta excelente adaptação à produção comercial, mas com agressividade baixa, proporcionando insucesso ao controle biológico no campo (ALMEIDA et al., 2007).

Os testes de seleções têm como principal função excluir isolados pouco virulentos e com baixa capacidade de penetração e germinação, selecionando os isolados com maior potencial para uma avaliação mais eficiente. Desta maneira, este estudo teve por objetivo comparar a virulência de um grupo de isolados de *Metarhizium* spp., previamente selecionados de um grande grupo e selecionar no mínimo cinco isolados com maior

potencial para serem utilizados como um bioinseticida para controle de *Diatraea saccharalis*.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de execução dos experimentos.

Os bioensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Produção de Agentes Biológicos – Biofábrica (Bioenergia do Brasil S/A), localizado na cidade de Lucélia – São Paulo.

2.2 Isolados estudados.

Vinte isolados de *Metarhizium* sp. de alta performance para agressividade e esporulação selecionados por Bovi (2012) e dois isolados de referência do Instituto Biológico, o IBCB 425 e ESALQ 1037 (Tabela 1), foram utilizados no presente estudo, dando continuidade aos trabalhos de seleção de isolados potenciais para desenvolvimento de bioinseticidas. Os isolados são originários de diversas regiões geográficas brasileiras (regiões sudeste e centro-oeste do Brasil) e de diferentes hospedeiros ou substratos. A Tabela 1 apresenta a localização dos isolados.

Tabela 1. Relação dos isolados selecionados de *Metarhizium spp.* utilizados nos bioensaios.

ISOLADO	CÓD ISOLADO CAPITULO III	ORIGEM	ANO DE COLETA	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCALIDADE
MBIO 01	MBIO 107	Fazenda Cassita	2011	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Lucélia - SP
MBIO 02		Fazenda Santa Luzia 3	2012	Amostra de Solo - cana	Lucélia - SP
MBIO 03		Fazenda Santa Luzia 3	2012	Amostra de Solo - cana	Lucélia - SP
MBIO 04		Fazenda Santa Luzia 3	2012	Amostra de Solo - cana	Lucélia - SP
MBIO 05	MBIO 104	Fazenda Cassita	2011	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Lucélia - SP
MBIO 06	MBIO 79	Fazenda Boa Esperança 2	2009	Amostra de Solo - cana	Cachoeira Alta - GO
MBIO 07		Usina Quatá - SP	2009	Amostra de Solo - cana	Quatá - SP
MBIO 08	MBIO 124	Fazenda Santa Luzia	2012	Amostra de Solo - cana	Lucélia - SP
MBIO 09	MBIO 87	Usina Rio Vermelho	2009	Amostra de Solo - cana	Junqueirópolis - SP
MBIO 10	MBIO 85	Fazenda Boa Esperança	2009	Amostra de Solo - cana	Cachoeira Alta - GO
MBIO 11	MBIO 62	Usina Rio Vermelho	2009	Amostra de Solo - cana	Junqueirópolis - SP
MBIO 12		Usina Rio Vermelho	2009	Amostra de Solo - cana	Junqueirópolis - SP
MBIO 13	MBIO 67	Fazenda 3 Meninas	2009	Amostra de Solo - cana	Tupi Paulista - SP
MBIO 14	MBIO 83	Águas de Santa Barbara	2009	Amostra de Solo - pasto	Água Santa Barbara - SP
MBIO 15		Usina TGM	2009	Amostra de Solo - pasto	Cerqueira César - SP
MBIO 16		Usina Central Energética Fazenda Nossa Sra. Aparecida	2009	Amostra de Solo - cana	Cachoeira Alta - GO
MBIO 17		Fazenda Boa Esperança	2009	Amostra de Solo - cana	Cachoeira Alta - GO
MBIO 18	MBIO 88	Rinópolis - SP	2009	Amostra de Solo - cana	Rinópolis - SP
MBIO 19	MBIO 48	UFRJ Ma 283 - <i>Metarhizium anisopliae</i>	2004	Amostra de Solo - cana	Sapezal - MT
MBIO 20	MBIO 105	Fazenda Cassita	2011	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Lucélia - SP

2.3 Obtenção de *Diatraea saccharalis*

Os insetos utilizados foram provenientes da Criação Massal de *Cotésia flavipes* do Laboratório de Produção de Agentes Biológicos – Biofábrica (Bioenergia do Brasil S/A), localizado na cidade de Lucélia – São Paulo.

Os insetos foram lavados em água corrente e em seguida imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante cinco minutos. Posteriormente, foram enxaguados em água destilada estéril e secos em papel toalha estéril para proporcionar a assepsia da cutícula das larvas de *Diatraea saccharalis*.

2.4 Preparo das suspensões de inóculo e viabilidade dos conídios.

Os 20 isolados de *Metarhizium* sp. foram cultivados em 23 ml de meio batata dextrose ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado com 1g de extrato de levedura (Technical, Difco) (PDAY) e meio de cultura aveia-ágar em placas de Petri (100 x 15 mm, Fisherbrand) mantidas a 25 °C ± 2 por 15 dias. Após esse período, os conídios de cada isolado foram colhidos separadamente com auxílio de uma espátula e suspensos em uma solução estéril de Tween 80 (0,01% v/v) (LUZ et al., 1998).

Obtida a suspensão, uma amostra foi quantificada em hematocítômetro ao microscópio óptico. Dessa forma, foi preparada para cada isolado uma suspensão ajustada à concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios por ml.

2.5 Avaliação da virulência de isolados de *Metarhizium* sp. sobre lagartas de *Diatraea saccharalis*

Isolados de *Metarhizium* sp. foram testados quanto à agressividade em lagartas de *D. saccharalis*. O delineamento experimental foi composto de 23 tratamentos, sendo 22 isolados de *Metarhizium* spp., incluindo os isolados de referência IBCB 425 e ESALQ 1037 de *M. anisopliae* (Tabela 1) e a testemunha, com 3 repetições para cada tratamento. A testemunha foi inoculada com água estéril e espalhante adesivo (0,01% de Tween 20).

Cada repetição foi constituída por 20 lagartas, ou seja, uma caixa de polipropileno para cada lagarta de *D. saccharalis* e previamente desinfestada conforme metodologia descrita no item 2.3, variando entre o 3º e 4º instar de desenvolvimento, sendo cada lagarta pulverizada com um borrifador com 120 µL de suspensão de esporos de *M. anisopliae* (10^8 esporos /mL). Posteriormente a pulverização, as lagartas que já estavam individualizadas

em placas de Petri juntamente com um cubo de colmo jovem de cana-de-açúcar (aproximadamente 4 x 4 cm) empregados para alimentação das lagartas foram mantidas em sala climatizada na temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. A cada dois dias os pedaços de colmo de cana-de-açúcar foram substituídos por pedaços novos.

Observações diárias foram realizadas, sendo a mortalidade avaliada no 5º, 10º e 20º dia da inoculação dos fungos, e cada isolado avaliado individualmente, através da contagem do número de indivíduos mortos e parasitados pelo fungo, sendo que, após observado a morte de uma lagarta, a mesma era transferida para uma nova caixa, previamente assepsiada e com algodão umedecido com água autoclavada, estabelecendo-se uma câmara úmida, a fim de proporcionar a extrusão do fungo pelo tegumento do inseto e confirmar sua morte. Foram considerados como mais agressivos aqueles isolados cuja taxa de parasitismo e morte tiver um número de indivíduos superior ao da testemunha. Nesse período, foi calculada, para cada isolado, a mortalidade acumulada definida por:

$$[= (\text{número de indivíduos mortos/número total de indivíduos}) * 100].$$

Os parâmetros avaliados foram: mortalidade confirmada, correspondente à mortalidade ocasionada pela colonização dos fungos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P=0,05$) com o uso do programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

2.6 Avaliação do Tempo Letal (TL₉₀) dos isolados de *Metarhizium* sp. sobre lagartas de *Diatraea saccharalis*

Para avaliar o Tempo Letal de cada isolado para causar mortalidade de 90% dos insetos foi realizado um experimento com delineamento experimental composto de 22 tratamentos, sendo 20 isolados de *Metarhizium* spp., e como controle foram utilizados os isolados de referência IBCB 425 e ESALQ 1037 de *M. anisopliae* (Tabela 1) com 3 repetições para cada tratamento. Cada repetição foi constituída por 20 lagartas, ou seja, uma caixa de polipropileno com uma lagarta de *D. saccharalis* individualizada e previamente desinfetada conforme metodologia descrita no item 2.3, variando entre o 3º e 4º instar de desenvolvimento sendo cada lagarta pulverizada com 120 µL de suspensão de esporos de *M. anisopliae* (10^8 esporos /mL). Posteriormente a pulverização, as lagartas que já estavam individualizadas em placas de Petri juntamente com um cubo de colmo jovem de cana-de-açúcar (aproximadamente 4 x 4 cm) empregados para alimentação foram

mantidas em sala climatizada na temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. A cada dois dias os pedaços de colmo de cana-de-açúcar foram substituídos por pedaços novos.

Observações diárias foram realizadas durante 10 dias após a inoculação dos fungos, e cada isolado avaliado individualmente, através da contagem do número de indivíduos mortos e parasitados pelo fungo, sendo que, após observado a morte de uma lagarta, a mesma era transferida para uma nova caixa, previamente assepsiada e com algodão umedecido com água autoclavada, estabelecendo-se uma câmara úmida, a fim de proporcionar a extrusão do fungo pelo tegumento do inseto e confirmar a morte do inseto. Os parâmetros avaliados foram: mortalidade confirmada, correspondente à mortalidade ocasionada pela colonização dos fungos para identificar a TL_{90} de cada isolado. Para tanto, foram feitos gráficos com linha de tendência polinomial de 3º grau dos 10 primeiros dias de avaliação de cada isolado para determinação da TL_{90} baseado na equação do gráfico, onde y é igual a 90% (Figuras 5 a 25).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P=0,10$) com o uso do programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da virulência de isolados de *Metarhizium* sp. sobre lagartas de *Diatraea saccharalis*

Todos os isolados avaliados demonstraram elevada virulência contra lagartas de *D. saccharalis*, diferindo estatisticamente do grupo controle (testemunha), onde não se observou mortalidade causada pelo fungo e todas as lagartas se transformaram em pupas, dando continuidade ao seu ciclo. No 5º dia após a inoculação do fungo (Tabela 2), os isolados apresentaram maiores variações nas taxas de mortalidade, variando de 20 a 97%, apresentando estatisticamente três grupos distintos, sendo o primeiro constituído por 17 isolados que apresentam taxas de mortalidade de 65 a 97%, ou seja, a maioria dos isolados demonstraram ser altamente agressivos a *D. saccharalis*. O segundo grupo, com quatro isolados, (MBIO 06, MBIO 19, MBIO 16 e MBIO 11), demonstrou agressividade mais baixa, que variou de 50 a 56%, e o terceiro grupo com apenas um isolado (MBIO 20) com taxa de mortalidade bem inferior aos outros isolados, com apenas 20% de mortalidade, sendo um isolado bem menos agressivo. Os valores estão provavelmente associados à

presença de enzimas que ajudam no processo de penetração dos fungos (ST. LEGER et al., 1988), bem como as toxinas, tais como a destruxinas, que causam variabilidade entre os isolados (Figura 4), sendo que alguns são dotados com capacidade de apresentar maior virulência e outros com pouca virulência.

No 10º e no 20º dia foi observado que os percentuais de mortalidade não diferiram entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, pois todos os tratamentos apresentaram altas taxas de mortalidade em ambos os tratamentos. Os resultados demonstraram que, de um modo geral, todos os isolados foram altamente agressivos a lagartas de *D. saccharalis* entre o 5º e o 10º dia, com percentuais de mortalidade de 78% a 100% (Tabela 2). Kanga et al. (2002), com a linhagem de *M. anisopliae* (Bio-Blast), sobre fêmeas de *Varroa destructor*, parasita de abelhas, obtiveram mortalidade de 90% no tempo letal (TL₉₀) de 5,85 dias, corroborando com os dados aqui obtidos, após o 5º dia. Isso ocorreu, pois este grupo de isolados já foi previamente selecionado por Bovi (2012), ou seja, que de um total de 73 isolados de *Metarhizium* ssp. foram selecionados os 20 isolados potenciais que estão sendo avaliados no presente trabalho e que com esse estudo atual foi possível comprovar a eficiência desses isolados no controle de *D. saccharalis*. Resultados semelhantes são encontrados na literatura, como os obtidos por Acevedo et al. (2007), que inocularam lagartas de *D. saccharalis* com dois isolados de *M. anisopliae* na concentração de $1,0 \times 10^8$ con/ml, a mesma utilizada neste estudo e obtiveram mortalidades de 60 e 100%, após 9 dias de avaliação.

Por isso, antes do desenvolvimento de um produto microbiano é importante efetuar bioensaios para a seleção de isolados e avaliar a relação de patogenicidade e virulência dos mesmos. Embora existam relatos na literatura de que o fungo entomopatógeno *Beauveria bassiana* é mais eficiente no controle de lagartas de *D. saccharalis*, o conhecimento da eficiência de meios alternativos ao uso de *C. flavipes*, como o fungo *Metarhizium anisopliae*, é de grande importância para alcançar o sucesso do controle biológico nos canaviais brasileiros, contribuindo para a sustentabilidade da agricultura em nosso país (ALVES, 1998). Segundo a conclusão do estudo de Detogni, (2010) e Bovi (2012), o isolado de *M. anisopliae* é patogênico para ovos e lagartas de *D. saccharalis* e sua ação diminui o peso e a viabilidade das pupas provenientes de lagartas tratadas enquanto que o isolado de *B. bassiana* é patogênico para lagartas de *D. saccharalis*.

Podemos concluir que todos os isolados de *M. anisopliae* apresentaram mortalidade acumulada iguais ou superiores a 90% quando avaliados até o 10º dia,

demonstrando a alta performance desse grupo de isolados selecionados e o potencial de *Metarhizium* spp. para o controle biológico de *D. saccharalis*, como podemos observar nos resultados e na Figura 5, apesar de ser muito indicado para controle de cigarrinhas. Bovi, (2012) avaliando a virulência de *Metarhizium* spp. para as fases do ciclo biológico de *D. saccharalis* pode selecionar diversos isolados que eram virulentos para ovos, pupas lagartas e adultos, ou seja, todas as fases do ciclo desta praga, demonstrando um biocontrolador eficiente desta praga independente da fase em que ela se encontra.

Tabela 2. Média da mortalidade acumulada de *Diatraea saccharalis* no 5º, 10º e 20º dia após inoculação com os isolados de *Metarhizium* spp.

TRATAMENTOS	%	5º DIA	10º DIA	20º DIA
		MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
Testemunha		0,00 e	0,00 c	0,00 b
MBIO 01		68,33 abc	90,00 a	91,67 a
MBIO 02		81,67 abc	100,00 a	95,00 a
MBIO 03		68,33 abc	88,33 a	95,00 a
MBIO 04		76,67 abc	90,00 a	86,67 a
MBIO 05		76,67 abc	93,33 a	100,00 a
MBIO 06		50,00 c	65,00 b	93,33 a
MBIO 07		66,67 abc	91,67 a	91,67 a
MBIO 08		83,33 abc	93,33 a	96,67 a
MBIO 09		76,67 abc	98,33 a	100,00 a
MBIO 10		65,00 abc	96,67 a	90,00 a
MBIO 11		56,67 bc	88,33 a	96,67 a
MBIO 12		81,67 abc	98,33 a	93,33 a
MBIO 13		83,33 abc	90,00 a	100,00 a
MBIO 14		73,33 abc	83,33 a	86,67 a
MBIO 15		80,00 abc	95,00 a	98,33 a
MBIO 16		50,00 bc	78,33 ab	88,33 a
MBIO 17		66,67 abc	88,33 a	93,33 a
MBIO 18		96,67 a	98,33 a	98,33 a
MBIO 19		50,00 bc	83,33 a	91,67 a
MBIO 20		20,00 d	95,00 a	98,33 a
IBC425		86,67 ab	88,33 a	96,67 a
ESALQ 1037		73,33 abc	90,00 a	91,67 a
CV		14,64 %	7,66 %	5,06 %

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade; CV- Coeficiente de Variação.

Figura 4. Taxa de mortalidade (%) de lagartas de *Diatraea accahralis* proporcionada por cada isolado do fungo *Metarhizium* spp. nos diferentes dias de avaliação (5º, 10º e 20º dia)

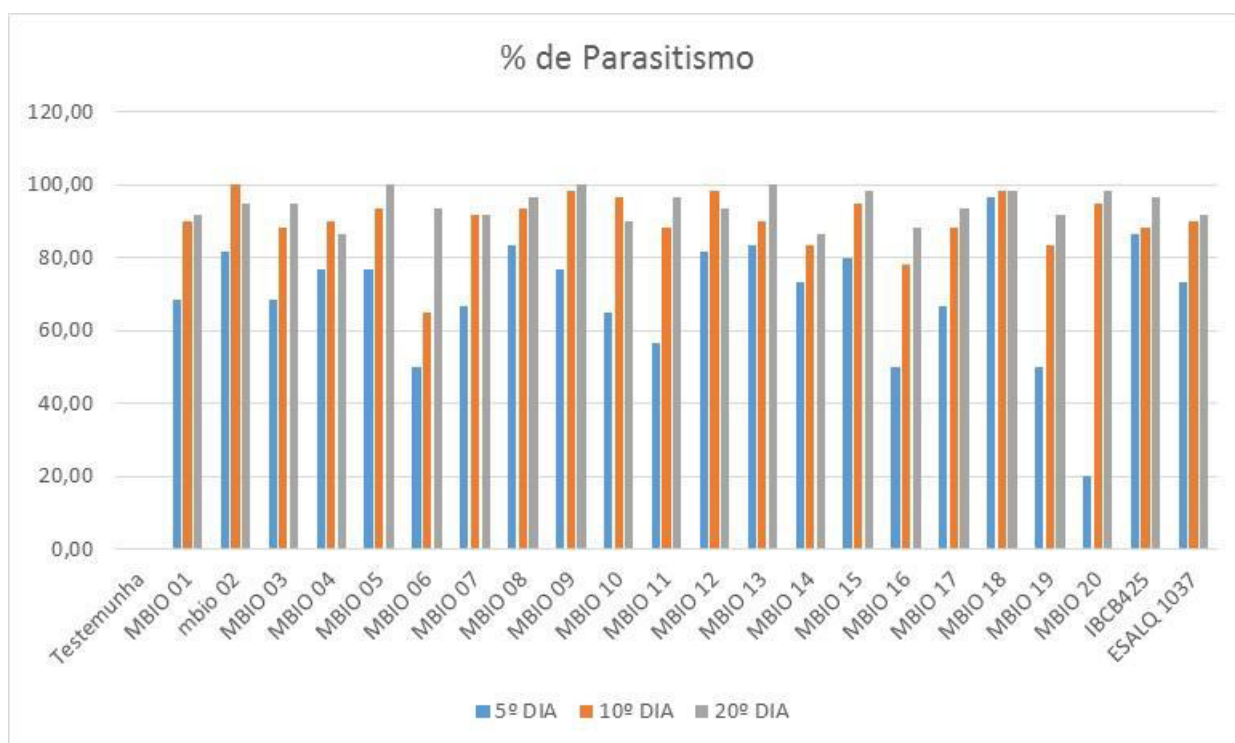


Figura 5. Lagartas de *Diatraea saccharalis* parasitadas pelo fungo *Metarhizium* spp.



3.2 Avaliação do Tempo Letal (TL₉₀) dos isolados de *Metarhizium* sp. sobre lagartas de *Diatraea saccharalis*

Os 20 isolados de *M. anisopliae* novamente apresentaram mortalidade acumulada iguais ou superiores a 90% quando avaliados até o 10º dia (Tabela 4) e a análise de variância indicou que não houve diferença entre os percentuais de mortalidade, resultados semelhantes e/ou iguais ao primeiro teste de seleção realizado no presente estudo (item 3.1). Porém os isolados mostraram diferenças na distribuição da mortalidade ao longo do

tempo (Tabela 3), a estimativa do tempo letal para matar 90% de uma população de insetos (TL₉₀), variou de 5,39 dias para M BIO 13, e a 7,49 dias para M BIO 20. Como observado na Tabela 3, a análise de TL₉₀ dos isolados a 5% de significância pelo teste de Scott-Knot proporcionou a separação dos isolados de *M.anisopliae* em dois grupos estatisticamente distintos, sendo 10 isolados alocados em um grupo, e 10 em outro, sendo que no primeiro grupo os TL₉₀ foram mais longos, variando de 6,63 a 7,49 dias, e no segundo grupo tiveram TL₉₀ mais curtos, de 5,39 a 6,30 dias. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os tempos letais para matar 90% da população foram bastante curtos em comparação com os obtidos por Torres et al. (1996), que obteve 100% de mortalidade com *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Premnotrypes vorax* em períodos de 9 a 11 dias, com uma concentração de 1×10^9 esporos/ml e períodos de 21 dias a uma concentração de 1×10^7 esporos/ml.

Zappellini et al. (2010) em seu trabalho de seleção com isolados de *Metarhizium anisopliae* para controlar *D. saccharalis* obtiveram dois isolados, IBCB 598 e IBCB 600, com tempos letais (TL₅₀) de 5,57 e 5,48 dias, onde ambos controlaram 98% das lagartas. Pauli, (2009) também estudando *Metarhizium anisopliae* para controle de *D. saccharalis*, só conseguiu TL₉₀ quando utilizou a concentração de 1×10^9 esporos/ml, com valores de 8,7 dias em média. A 1×10^8 esporos/ml, mesma concentração utilizada nesse trabalho não obteve TL₉₀. O tempo médio para causar a mortalidade pode estar atribuído a vários fatores, entre eles a infectividade do isolado e a resistência do inseto. A resistência das lagartas aos fungos entomopatogênicos está positivamente relacionada com o melanismo da cutícula e com suas defesas da hemolinfa, mas quando uma grande quantidade de conídios do entomopatógeno é utilizada para infectá-las, vários deles conseguem penetrar a cutícula e causar a morte das lagartas em um curto período de tempo (WILSON et al., 2001). Sendo assim, este é um estágio de vida dos insetos com grande susceptibilidade aos hifomicetos. Além do mais, o fungo pode atuar mais rapidamente, ainda no 2º e 3º ínstar, não permitindo o crescimento das lagartas o que diminui o dano causado por essa praga na cultura de cana-de-açúcar, demonstrando dessa maneira a importância das avaliações de TL₉₀ nos testes de seleção de isolados entomopatogênicos, pois quanto menor o valor de TL₉₀ mais eficiente é o isolado, pois sua ação contra a praga será mais rápida.

Para Alves (1998b), os testes de seleção de isolados são a base para a implantação de um programa de controle microbiano de pragas consistente e bem-sucedido, representando também uma etapa fundamental no processo de desenvolvimento de um bioinseticida. Este procedimento é recomendado principalmente devido à enorme

variabilidade genética existente entre os entomopatógenos, o que lhes confere diferentes e importantes características como virulência e patogenicidade a grupos específicos de insetos.

Tabela 3. Avaliação do tempo sob a mortalidade de *D. saccharalis*. Médias (% de indivíduos mortos) da mortalidade de *Diatraea saccharalis* provocada pelo fungo *Metarhizium* spp. até o 10º dia de avaliação.

%10DIAS	
TRATAMENTOS	MÉDIAS
MBIO 01	90,00 a
MBIO 02	100,00 a
MBIO 03	91,67 a
MBIO 04	90,00 a
MBIO 05	93,33 a
MBIO 06	90,00 a
MBIO 07	91,67 a
MBIO 08	93,33 a
MBIO 09	98,33 a
MBIO 10	96,67 a
MBIO 11	93,33 a
MBIO 12	98,33 a
MBIO 13	90,00 a
MBIO 14	93,33 a
MBIO 15	95,00 a
MBIO 16	90,00 a
MBIO 17	90,00 a
MBIO 18	98,33 a
MBIO 19	90,00 a
MBIO 20	95,00 a
IBCB425	90,00 a
ESALQ 1037	91,67 a
C.V.	4,03 %

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade; CV- Coeficiente de Variação.

Tabela 4. Avaliação do tempo sob a mortalidade de *D. saccharalis*. Médias (dias) da TL₉₀ dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. sob *Diatraea saccharalis*.

TL 90	
TRATAMENTOS	MÉDIAS (dias)
MBIO 01	6,67 a
MBIO 02	7,12 a
MBIO 03	7,16 a
MBIO 04	6,26 b
MBIO 05	5,91 b
MBIO 06	6,12 b
MBIO 07	7,39 a
MBIO 08	7,30 a
MBIO 09	6,15 b
MBIO 10	6,63 a
MBIO 11	6,28 b
MBIO 12	6,51 b
MBIO 13	5,39 b
MBIO 14	6,30 b
MBIO 15	6,77 a
MBIO 17	7,45 a
MBIO 18	5,64 b
MBIO 19	6,83 a
MBIO 20	7,49 a
IBCB425	5,68 b
ESALQ 1037	6,85 a
C.V.	13,06 %

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade; CV- Coeficiente de Variação.

Figura 06. TL₉₀ do MBIO 01 repetição 1, 2 e 3 respectivamente

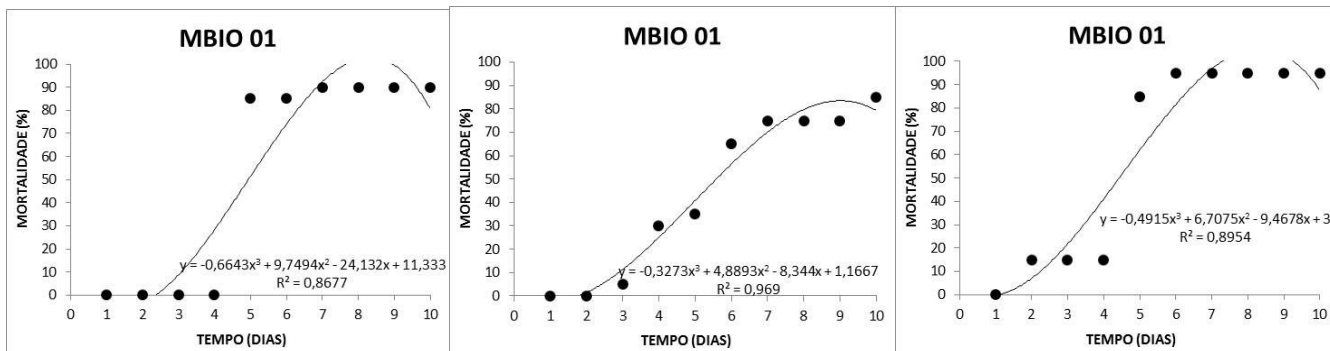


Figura 07. TL₉₀ do MBIO 02 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

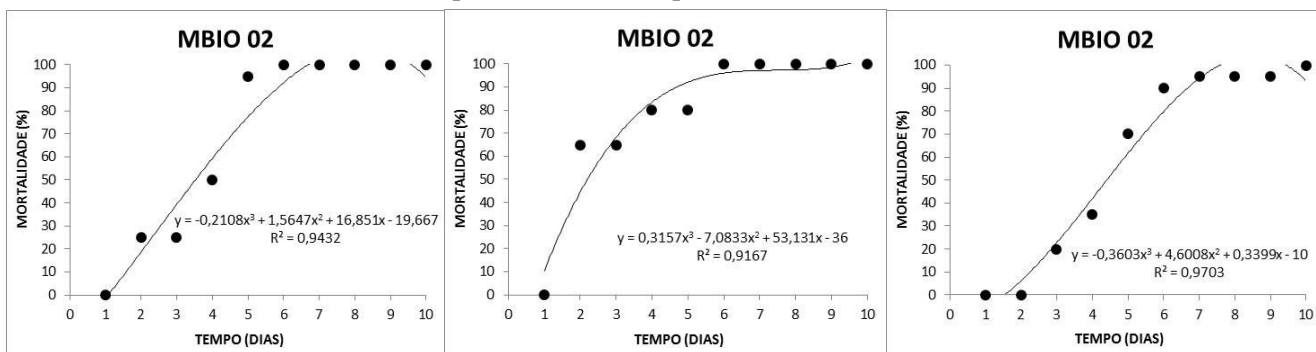


Figura 08. TL₉₀ do MBIO 03 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

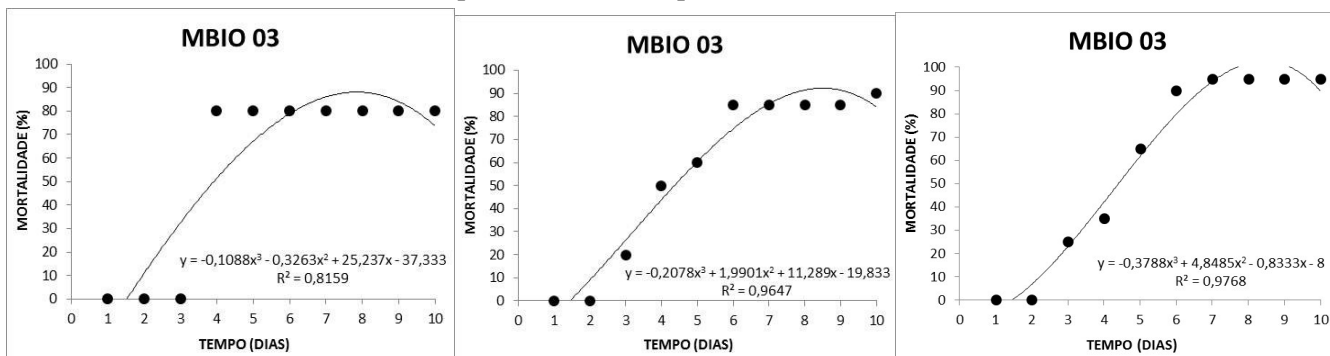


Figura 09. TL₉₀ do MBIO 04 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

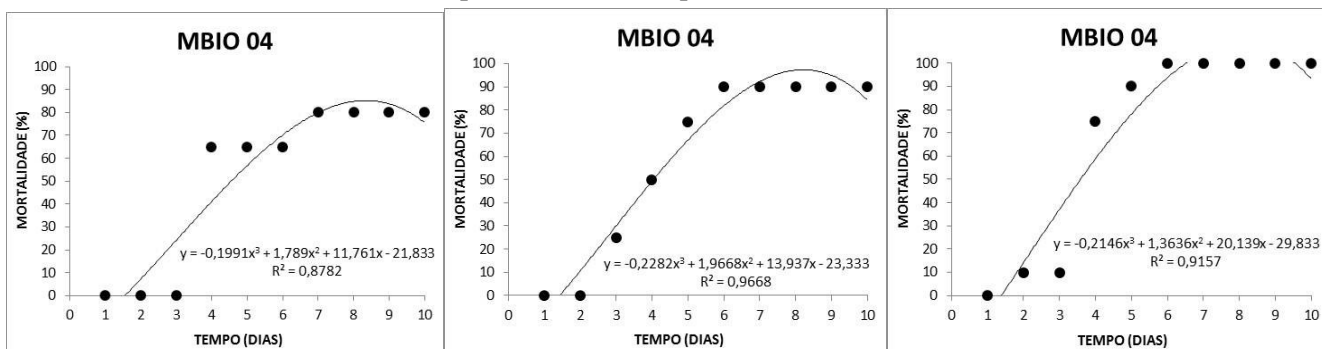


Figura 10. TL₉₀ do MBIO 05 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

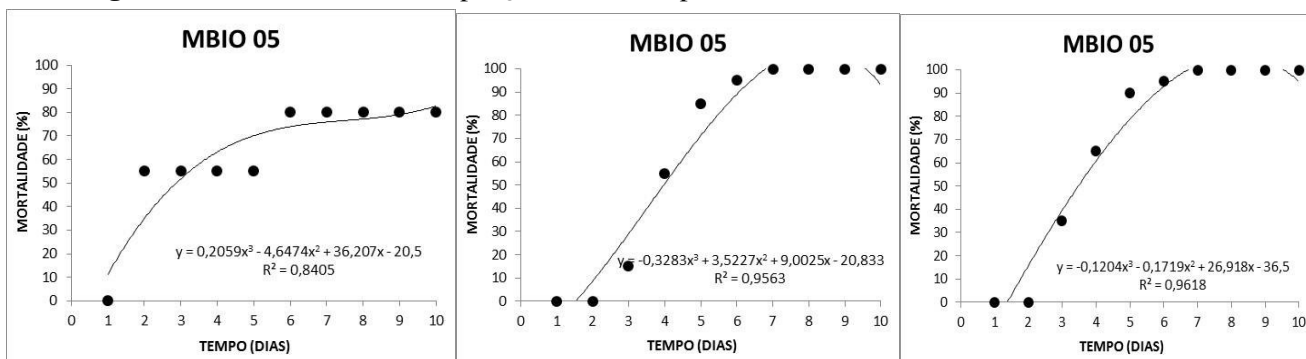


Figura 11. TL₉₀ do MBIO 06 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

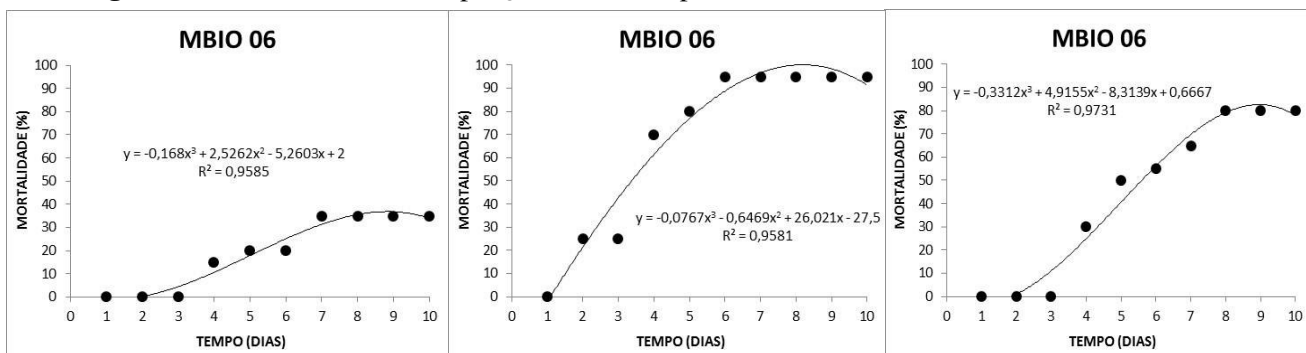


Figura 12. TL₉₀ do MBIO 07 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

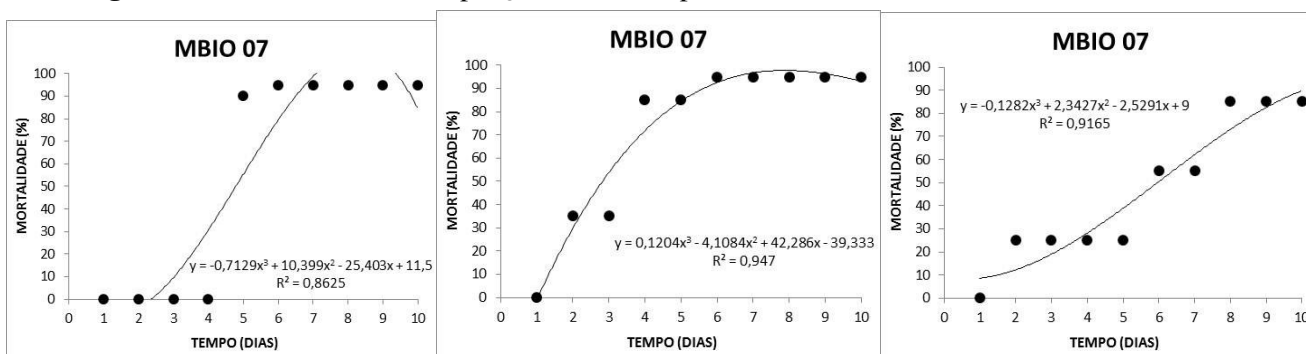


Figura 13. TL₉₀ do MBIO 08 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

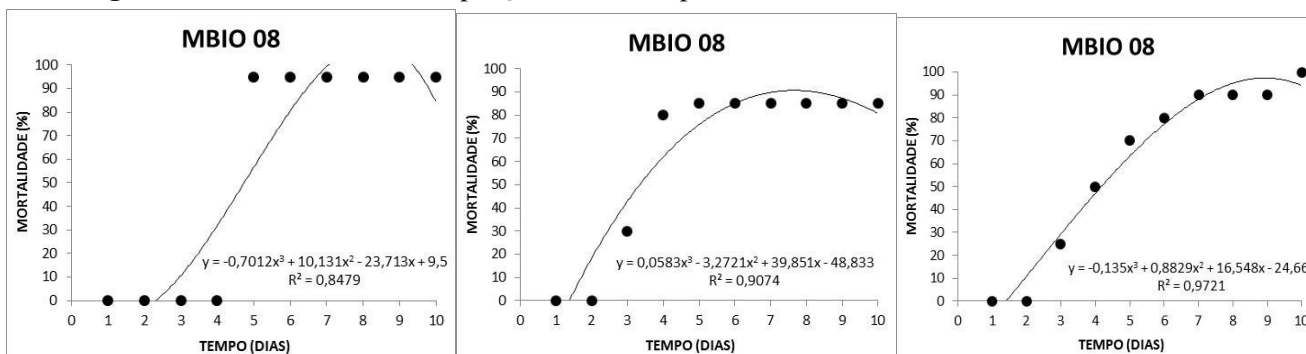


Figura 14. TL₉₀ do MBIO 09 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

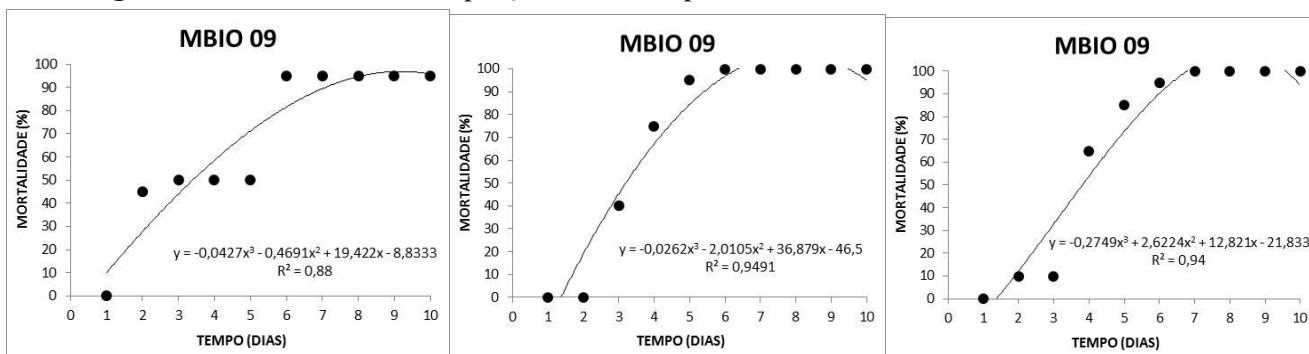


Figura 15. TL₉₀ do MBIO 10 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

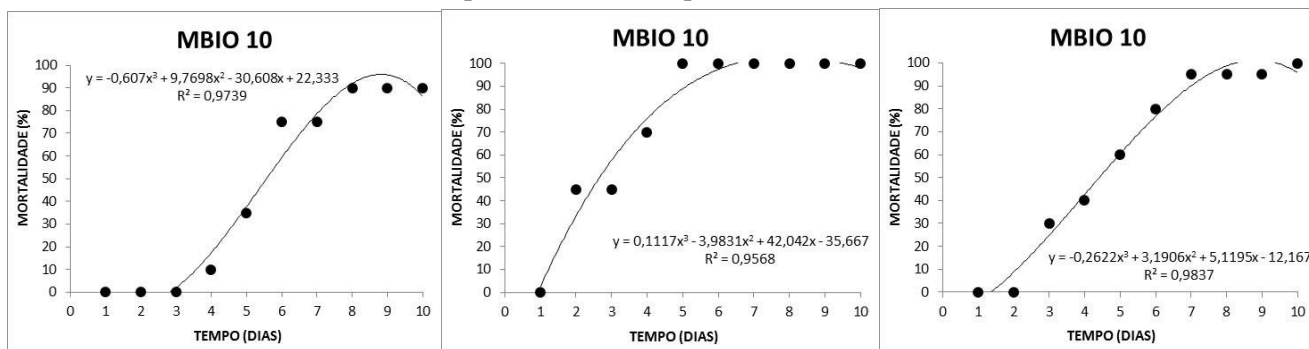


Figura 16. TL₉₀ do MBIO 11 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

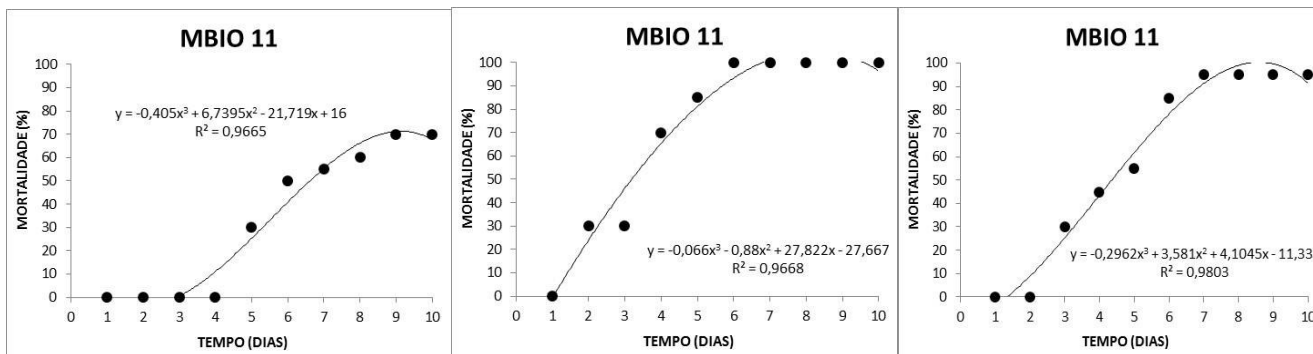


Figura 17. TL₉₀ do MBIO 12 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

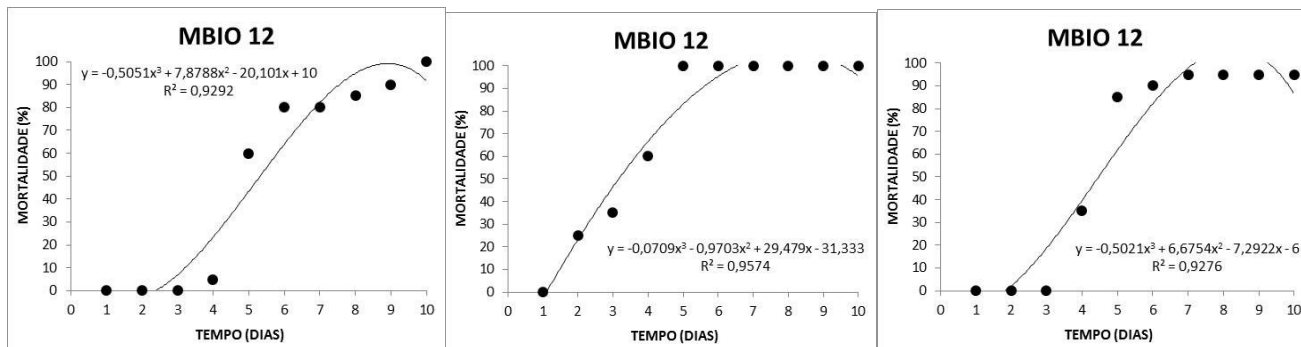


Figura 18. TL₉₀ do MBO 13 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

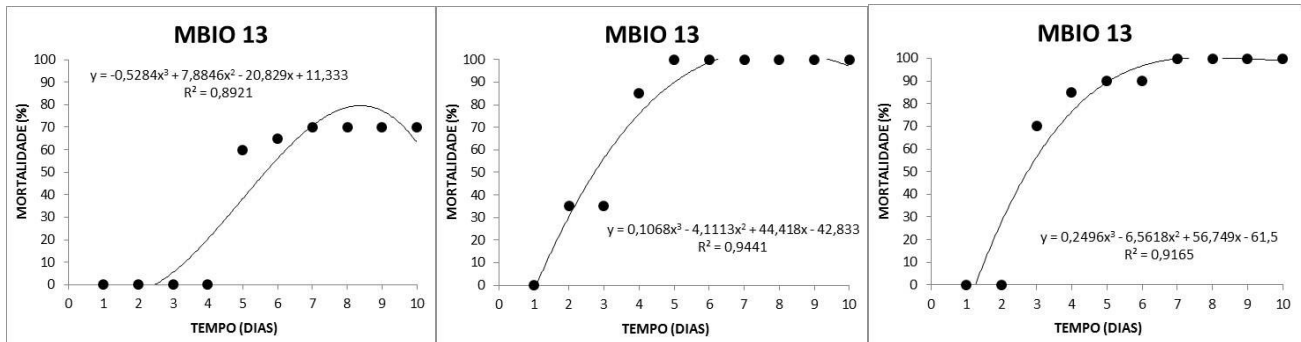


Figura 19. TL₉₀ do MBO 14 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

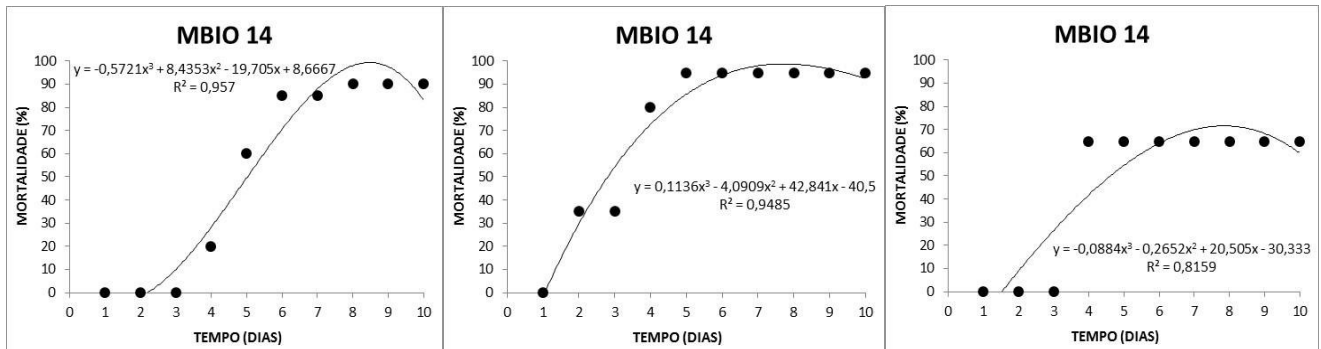


Figura 20. TL₉₀ do MBO 15 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

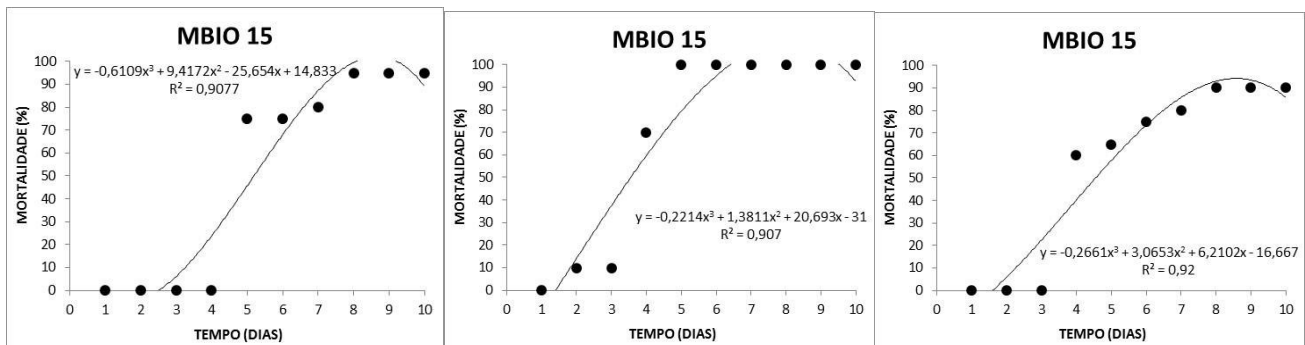


Figura 21. TL₉₀ do MBO 16 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

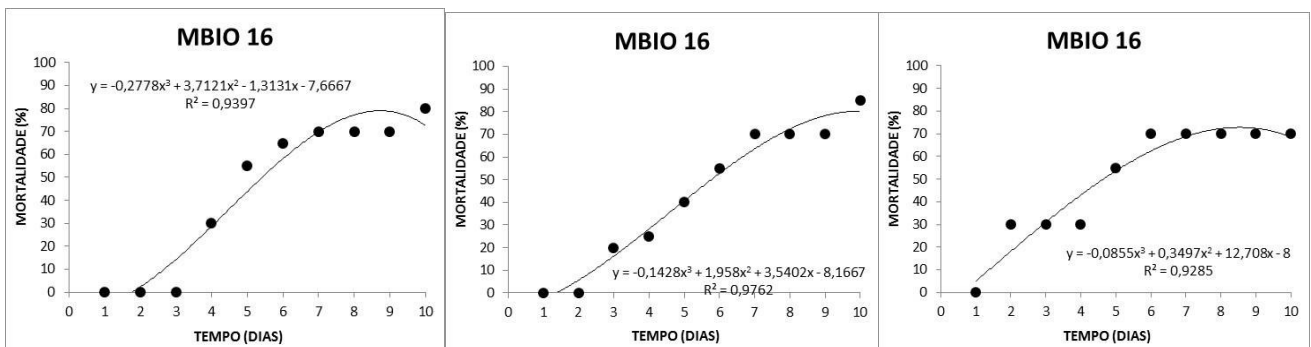


Figura 22. TL₉₀ do MBIO 17 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

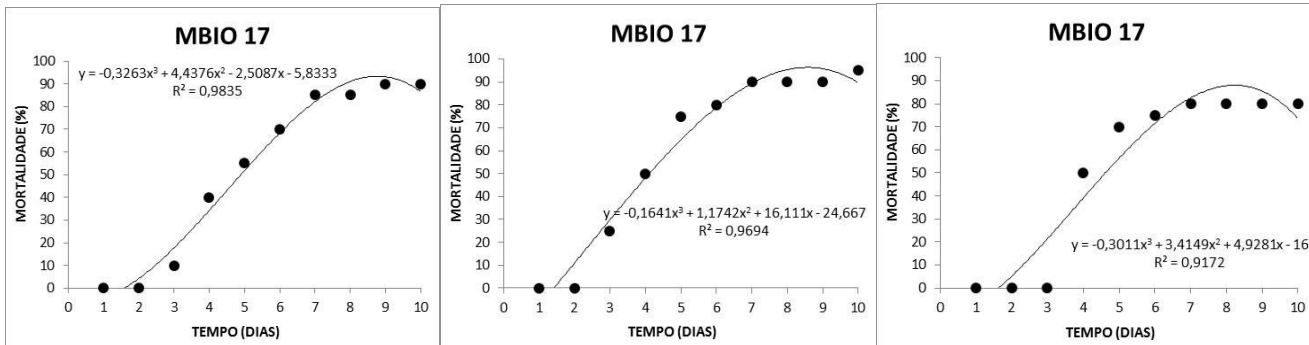


Figura 23. TL₉₀ do MBIO 18 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

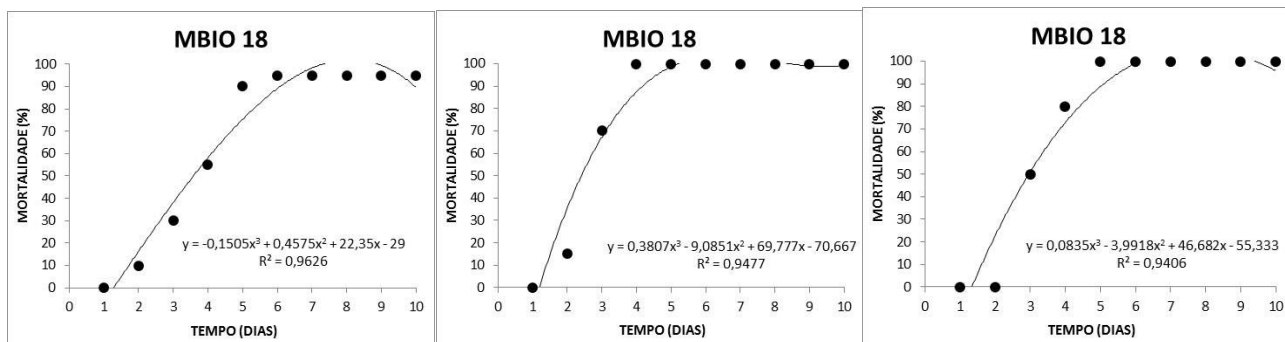


Figura 24. TL₉₀ do MBIO 19 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

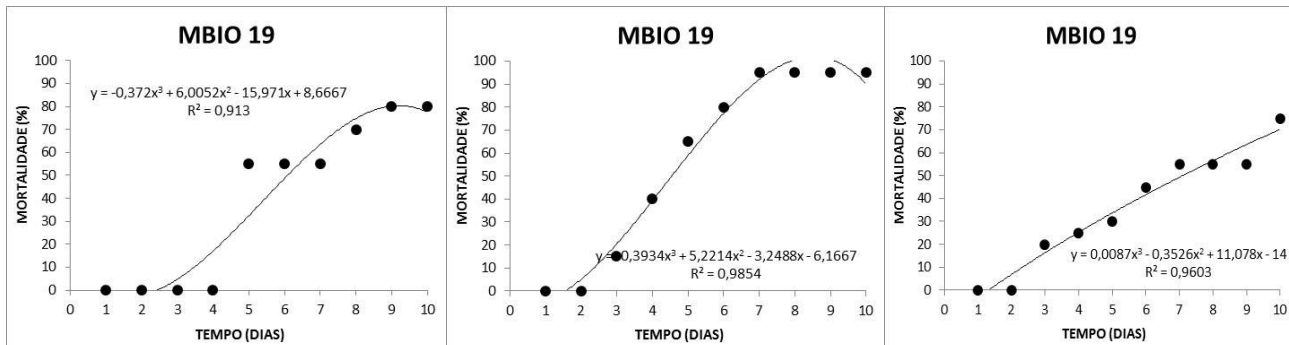


Figura 25. TL₉₀ do MBIO 20 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

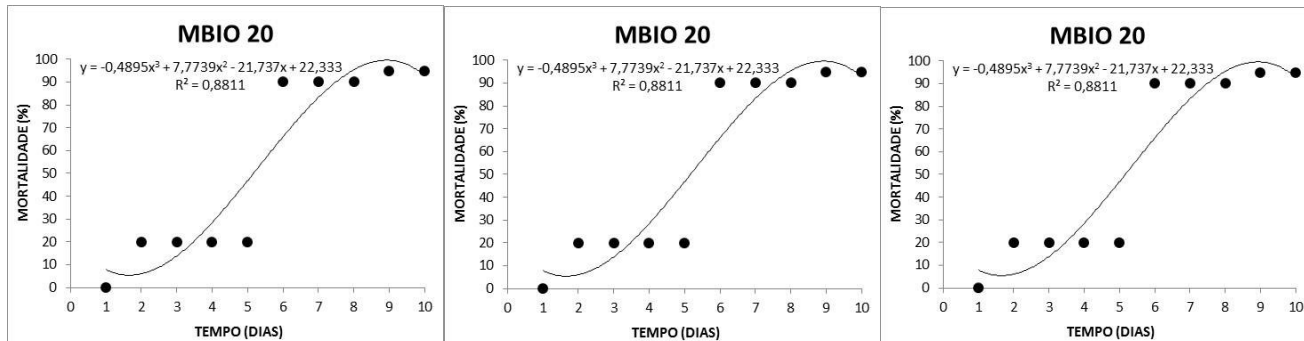


Figura 26. TL₉₀ do IBCB 425 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.

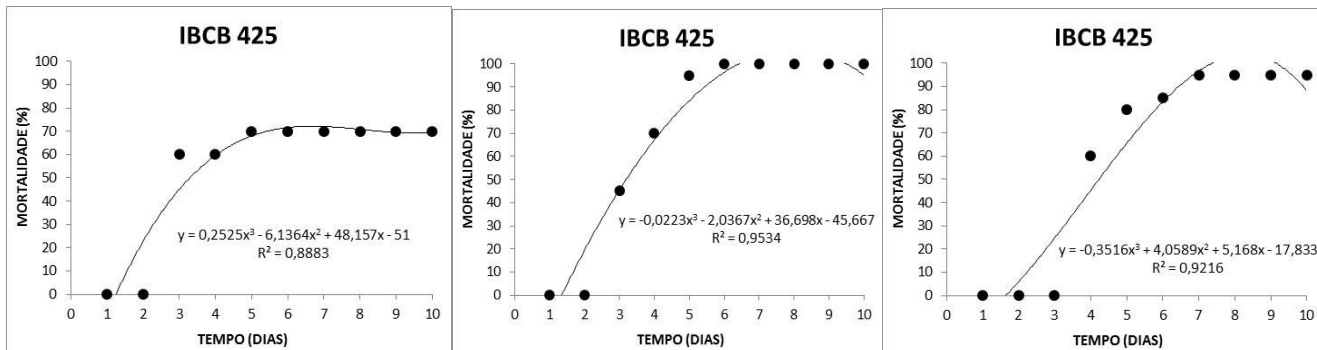
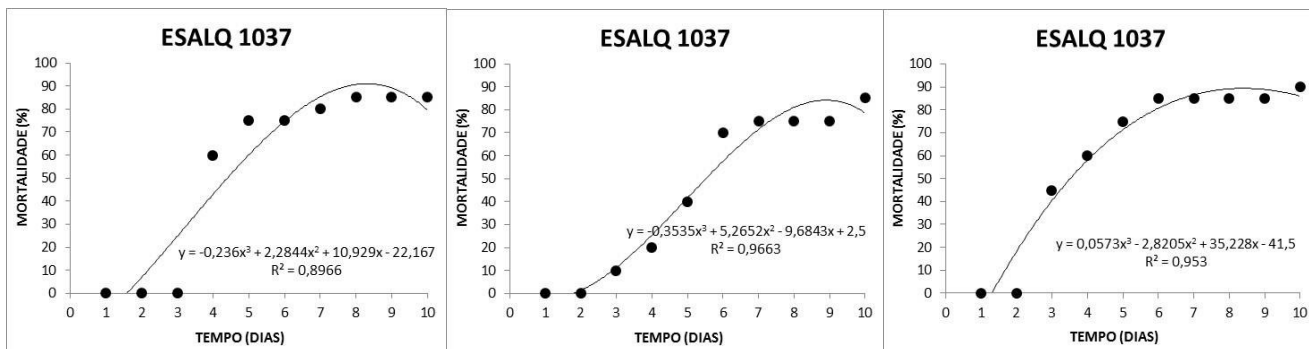


Figura 27. TL₉₀ do ESALQ 1037 repetição 1, 2 e 3 respectivamente.



CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS
DE *Metarhizium anisopliae* COM *Cotesia flavipes*

1- INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de pesticidas é prejudicial para o ambiente e a saúde humana aumentando também a resistência dos insetos aos pesticidas, levando a utilizar doses ainda mais elevadas. Estratégias de manejo alternativo de pragas, como o controle biológico, são necessárias para reduzir o uso intensivo de pesticidas na agricultura. No Brasil, existem vários casos de sucesso do uso do controle biológico em várias culturas. A cultura da cana-de-açúcar no Brasil é altamente tecnificada e possui um dos maiores programas de controle biológico do mundo, onde a praga é controlada com o inimigo natural *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae), um agente de controle eficiente da Broca (*Diatraea saccharalis*, Lepdoptera), segundo Parra et al. (2010). A *D. saccharalis* pode ser combatida com parasitoides, predadores e entomopatógenos (ALVES; LOPES, 2008; MACEDO; BOTELHO, 1988). Assim, a liberação massal de *C. flavipes* e a aplicação de fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* são comumente feitas pelas usinas sucroalcooleiras do Brasil, no entanto, há necessidade de avaliar os efeitos das interações entre estes organismos para otimização do controle, pois podem causar impactos aos parasitoides benéficos e outros insetos não-alvos sinergicamente ou antagonicamente (ALVES & LOPES, 2008; DELPUECH & DELAHAYE, 2013). As interações entre entomopatógenos e parasitoides podem ser analisadas de diversas maneiras pois os patógenos podem ou não prejudicar os inimigos naturais, dependendo de fatores como a espécie, o isolado, a concentração e a espécie do parasitoide.

Os bioinseticidas podem desempenhar um papel crucial nas estratégias de MIP (Manejo Integrado de Pragas), embora eles representem apenas cerca de 4% do mercado global de pesticidas, pois têm alta compatibilidade com outras técnicas de manejo de pragas, como inimigos naturais, variedades resistentes, produtos fitossanitários, etc. A integração de bioinseticidas poderia melhorar o desempenho de estratégias de MIP (SRINIVASAN, 2012). No entanto, a aplicação conjunta de distintos agentes de controle biológico exige cuidados quanto à compatibilidade entre os organismos. Sendo assim, a compatibilidade entre os agentes de controle biológico deve ser avaliada para determinar os possíveis efeitos das integrações negativas entre os organismos para aumentar a eficácia do Manejo Integrado de Pragas, como, por exemplo, a ação antagônica que pode culminar na perda de um ou mais dos organismos inoculados e inviabilizar o manejo (GUIMARÃES et al., 2013).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a compatibilidade de diferentes isolados de *M. anisopliae* ao parasitóide *C. flavipes* para determinar os possíveis efeitos, como patogenicidade e antagonismo e ainda fornecer informações sobre novas estratégias para utilização no Manejo Integrado da broca da cana-de-açúcar no Brasil.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de execução dos experimentos.

Os bioensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Produção de Agentes Biológicos – Biofábrica (Bioenergia do Brasil S/A), localizado na cidade de Lucélia – São Paulo.

2.2 Isolados estudados.

Vinte isolados de *Metarhizium* sp. de alta performance para agressividade e esporulação selecionados por Bovi (2012) e dois isolados de referência do Instituto Biológico e ESALQ/USP, o IBCB 425 e ESALQ 1037 (Tabela 1), foram utilizados no presente estudo, dando continuidade aos trabalhos de seleção de isolados potenciais para desenvolvimento de bioinseticidas. Os isolados são originários de diversas regiões geográficas brasileiras e de diferentes hospedeiros ou substratos (Tabelas 1).

2.3 Obtenção dos indivíduos de *Cotesia flavipes*

Os insetos utilizados foram provenientes da Criação Massal de *Cotésia flavipes* do Laboratório de Produção de Agentes Biológicos – Biofábrica (Bioenergia do Brasil S/A), localizado na cidade de Lucélia – São Paulo.

Adquiridos os insetos, estes foram levados para o laboratório e seus casulos em ponto de eclosão separados em caixas de polipropileno, com uma média de 600 indivíduos de *C. flavipes* por caixa.

2.4 Preparo e viabilidade dos esporos.

Os 20 isolados de *Metarhizium spp.* e os e isolados de referência IBCB 425, ESALQ 1037 foram cultivados em 23 ml de meio batata dextrose ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI), suplementado com 1g de extrato de levedura (Technical, Difco) (PDAY) e

meio de aveia-ágar em placas de Petri (100 × 15 mm, Fisherbrand) mantidas a 25 °C por 15 dias. Após esse período, os conídios de cada isolado foram colhidos em separado com auxílio de uma espátula e suspensos em solução estéril de Tween 80 (0,01% v/v) (LUZ *et al.*, 1998). A avaliação da viabilidade do isolado foi determinada pela contagem dos conídios germinados e não germinados em microscópio óptico, 16 horas após o plaqueamento em BDA, sendo tomados 100 conídios por placa para obtenção da porcentagem de germinação, que deveria estar acima de 85%. Após a constatação da viabilidade de cada isolado, os esporos foram pesados com o auxílio de uma balança analítica de maneira a se obter uma quantidade de 4,8 mg que foram armazenados em tubos plásticos. Foram preparados 10 tubos para cada isolado.

2.5 Avaliação da Evolução da patogenicidade de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. para *Cotesia flavipes* em função do tempo

O delineamento experimental foi composto de 22 tratamentos (Tabela 5) incluindo o isolado de referência IBCB 425 de *M. anisopliae* e a testemunha, com 4 repetições para cada tratamento. Para a testemunha foram utilizados copos plásticos contendo massas de *C. flavipes* (ponto eclosão) sem o fungo.

Para a montagem do experimento, os tubos plásticos contendo os esporos preparados previamente conforme o item 2.4, foram utilizados para inocular as massas de *C. flavipes* (ponto eclosão) que estavam dentro dos copos plásticos com uma média de 1500 indivíduos de *C. flavipes*. Após inoculação, os copos plásticos contendo os indivíduos de *C. flavipes* com o fungo foram separadas em bandejas plásticas e classificadas nos tratamentos apresentados na Tabela 5.

Cada tratamento continha 20 copos, quatro para cada um dos cinco dias de avaliação, totalizando 440 copos no experimento, mantidos em sala climatizada na temperatura de $\pm 26^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

As amostras eram destrutivas, sendo a mortalidade avaliada após 24, 48, 72, 96 e 120 h da aplicação dos fungos. A variável avaliada foi a taxa (%) da mortalidade do parasitoide *C. flavipes*. Foi utilizado um software de contagem de *C. flavipes* desenvolvido pela *Smartbio Desenvolvimento Tecnológico Ltda.*, considerando que cada copo possuía inicialmente a média de 1.500 indivíduos do parasitoide.

Os parâmetros avaliados foram: mortalidade confirmada, correspondente à mortalidade ocasionada pela colonização dos fungos, e longevidade dos adultos. Os dados

foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott (P=0,05) com o uso do programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

Foram construídos gráficos para cada tratamento para obter a curva de evolução da mortalidade de cada isolado, isolado de referência e testemunha e suas respectivas equações para posteriormente realizar o cálculo da Área Abaixo da Curva da Evolução da Mortalidade – AACEM. A AACEM foi obtida utilizando a Integral definida dos gráficos (X e Y) da função Polinomial de 3ª ordem e o eixo x em um intervalo [a, b], sendo os intervalos de [2,1] (48HAE), [3,1] (72HAE) e [5,1] (120HAE), de acordo com a seguinte equação:

$$A = \int_a^b [f(x) - g(x)]dx$$

Tabela 5: Tratamentos e respectivos isolados de *Metarhizium* spp. utilizados no experimento.

Tratamentos	Isolados <i>Metarhizium</i> spp.
T1	TESTEMUNHA
T2	MBIO 01
T3	MBIO 02
T4	MBIO 03
T5	MBIO 04
T6	MBIO 05
T7	MBIO 06
T8	MBIO 07
T9	MBIO 08
T10	MBIO 09
T11	MBIO 10
T12	MBIO 11
T13	MBIO 12
T14	MBIO 13
T15	MBIO 14
T16	MBIO 15
T17	MBIO 16
T18	MBIO 17
T19	MBIO 18
T20	MBIO 19
T21	MBIO 20
T22	IBCB 425

2.6 Avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. para *Cotesia flavipes* após 72HAE.

O delineamento experimental foi composto de 23 tratamentos (Tabela 5) incluindo os isolados de referência IBCB 425 e ESALQ 1037 de *M. anisopliae* e a testemunha, com 4 repetições para cada tratamento. Para a testemunha foram utilizadas

caixas de polipropileno contendo massas de *C. flavipes* (ponto eclosão) sem o fungo. Esse experimento foi repetido por três vezes (Experimento 1, Experimento 2 e Experimento 3).

Para a montagem do experimento, os tubos plásticos contendo os esporos preparados previamente conforme o item 2.4 de cada tratamento foram utilizados para inocular as massas de *C. flavipes* (ponto eclosão) que estavam dentro das caixas de polipropileno com uma média de 600 indivíduos de *C. flavipes*, representando cada repetição. Após inoculação, as caixinhas foram separadas em bandejas plásticas e classificadas nos tratamentos da Tabela 5.

Após a classificação dos tratamentos, os mesmos foram mantidos em sala climatizada na temperatura de $\pm 26^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Após 72 horas da inoculação, as amostras foram abertas e os indivíduos ainda vivos foram transferidos para caixinhas vazias para posterior contagem de indivíduos mortos, vivos e casulos (indivíduos que não eclodiram). A variável avaliada foi a mortalidade do parasitoide *C. flavipes* em porcentagem (%). Foi utilizado o software de contagem de *C. flavipes*, considerando que cada copo possuía em média inicialmente 600 indivíduos do parasitóide.

Os parâmetros avaliados foram: mortalidade confirmada, correspondente à mortalidade ocasionada pela colonização dos fungos, e longevidade dos adultos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P=0,05$), empregando-se o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001)

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da Evolução da patogenicidade de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. para *Cotesia flavipes* em função do tempo

A mortalidade cumulativa de indivíduos de *C. flavipes* expostos a diferentes isolados de *Metarhizium* spp. foi, para a maioria dos isolados, estatisticamente iguais à testemunha, quando os dados foram analisados após 24 horas da exposição (HAE) (Tabela 6), com exceção dos isolados MBIO 18, MBIO 17, MBIO 15, MBIO 12, MBIO 07 e MBIO 03 para os quais a mortalidade acumulada indicou maior patogenicidade ao nível de 5% de significância pelo teste de Scott-Knot.

As mortalidades em 48 e 72 HAE foram as que mais apresentaram variações entre os tratamentos, ou seja, com taxas de mortalidade de 10 a 49% e 29 a 84%, respectivamente. Esse fato pode ser associado à variabilidade genética entre isolados em

função da diferença na produção de enzimas (quitinases, proteases e lípases por exemplo) e toxinas, na velocidade de germinação dos conídios, na atividade mecânica de penetração na cutícula e na capacidade de colonização dos isolados (PACCOLA-MEIRELLES et al., 1990). Também pode ser observada a patogenicidade do fungo *Metarhizium* spp. aos indivíduos de *C. flavipes*, pois a maioria dos isolados apresentaram uma taxa de mortalidade bem acima da testemunha. Mesmo o isolado MBIO 11, que apresentou a menor taxa de mortalidade (10,55%) em 48HAE, foi mais patogênico que a testemunha que apresentou taxa de mortalidade de 4,25%, porém não diferindo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Skott-Knot. Apenas cinco isolados apresentaram valores de mortalidade acumulada estatisticamente iguais aos valores da testemunha, sendo eles, MBIO 01, MBIO 05, MBIO 11, MBIO 16 e MBIO 19. Os resultados obtidos por Rossoni *et al.* (2014) em seu estudo avaliando adultos de *C. flavipes* expostos a diferentes produtos comerciais a base de *M. anisopliae*, em função das horas após a exposição ao fungo, foram semelhantes aos obtidos neste trabalho, pois houve variação nas taxas de mortalidade ao longo do tempo de um produto para o outro, sendo compostos por isolados diferentes (Biometha Plus isolado PL43, Metarril WP isolado Esalq E9 e o Metiê WP isolado IBCB 425), onde um produto foi mais patogênico que todos e a testemunha apresentou valores de mortalidade próximas aos valores obtidos nesse trabalho em todas as horas avaliadas.

Em 72 HAE, apenas um grupo de oito isolados apresentou taxas de mortalidade estatisticamente iguais à testemunha (36,93%), sendo os cinco isolados que mais se destacaram foram MBIO 11, MBIO 10, MBIO 13, MBIO 16 e MBIO 20. A baixa patogenicidade de isolados, ou seja, as menores taxas de mortalidade de indivíduos de *C. flavipes* a 24, 48 e 72 HAE é importante porque o período de vida do adulto destes parasitóides é de aproximadamente 72 h em laboratório a $24 \pm 2^\circ \text{C}$ e em campo somente algumas horas após sua liberação que deve ocorrer após 24 a 48h de vida (Simões et al., 2012).

A mortalidade acumulada de adultos de *C. flavipes* expostos aos diferentes isolados de *Metarhizium* spp foram igualmente altas entre os tratamentos, após 96 e 120 HAE (Tabela 6). No entanto, em 96HAE, os isolados MBIO 10, MBIO 13, MBIO 11, MBIO 09 e MBIO 20 foram menos patogênicos, diferindo estatisticamente dos demais. A 120HAE os dados não diferiram estatisticamente, pois praticamente todos os indivíduos de *C. flavipes* já estavam mortos pelo fato de terem completado o seu ciclo de vida, sendo muito tempo para análise, ao contrário de 24HAE que foi considerado pouco tempo para

análise, pois os indivíduos estavam eclodindo. Assim, ressalta-se que a baixa patogenicidade dos isolados a 24HAE e longevidade de *C. flavipes* a partir de 96HAE influenciaram os resultados obtidos no experimento, uma vez que o adulto do parasitoide possui ciclo de vida curto (CRUZ, 2007). Sendo assim, os resultados do presente estudo indicam que a patogenicidade no intervalo de 48HAE a 72HAE deve ser escolhida para se avaliar a variabilidade desse caráter entre diferentes isolados de *Metarhizium* spp.

Tabela 6. Porcentagem da Mortalidade de adultos de *Cotesia flavipes* após exposição a esporos de vários isolados de *Metarhizium* spp., em laboratório, por um período de 24 até 120 horas (HAE) em $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $70\pm 10\%\text{UR}$.

TRATAMENTO	24HAE	48HAE	72HAE	96HAE	120HAE
"TESTEMUNHA"	0,67±0,22 c	4,25±2,35 c	36,93±25,37 b	83,95±14,84 a	92,95±7,37 a
MBIO 01	1,26±0,63 c	13,00±4,40 c	65,21±19,16 a	90,35±6,70 a	100,00±0,00 a
MBIO 02	2,85±2,19 c	20,62±5,47 b	63,13±27,90 a	94,65±2,36 a	98,03±3,85 a
MBIO 03	4,50±2,45 b	38,37±16,35 a	66,85±14,81 a	74,53±9,95 a	89,50±12,70 a
MBIO 04	2,18±2,02 c	20,77±3,52 b	61,22±16,03 a	81,02±9,80 a	100,00±0,00 a
MBIO 05	1,05±0,65 c	15,00±8,11 c	84,75±29,09 a	85,07±16,95 a	96,02±7,80 a
MBIO 06	1,55±1,37 c	42,13±5,45 a	64,68±28,34 a	84,68±10,11 a	93,89±7,12 a
MBIO 07	4,77±3,10 b	49,42±33,20 a	61,85±20,64 a	78,42±15,22 a	91,50±15,25 a
MBIO 08	1,00±0,55 c	33,26±3,59 a	46,37±9,17 b	74,62±16,31 a	71,60±23,23 a
MBIO 09	1,67±1,31 c	34,00±3,70 a	69,43±14,40 a	66,80±22,13 b	84,87±17,12 a
MBIO 10	1,98±0,55 c	23,97±15,12 b	43,37±7,68 b	42,98±9,29 c	78,30±12,58 a
MBIO 11	1,54±0,85 c	10,55±7,02 c	29,60±15,07 b	63,27±4,18 b	86,52±10,48 a
MBIO 12	4,35±3,34 b	32,75±4,02 a	52,73±31,21 b	79,57±14,13 a	88,97±8,39 a
MBIO 13	1,59±0,40 c	21,97±0,86 b	43,04±20,74 b	55,60±8,04 b	94,22±8,87 a
MBIO 14	2,13±1,11 c	31,23±12,01 a	47,52±7,94 b	78,20±16,13 a	95,90±6,26 a
MBIO 15	8,47±4,26 a	34,57±17,06 a	72,25±6,48 a	77,45±8,07 a	97,42±4,97 a
MBIO 16	2,35±1,02 c	14,52±2,48 c	37,02±12,27 b	91,87±10,58 a	89,70±7,82 a
MBIO 17	11,01±10,68 a	33,57±17,77 a	75,19±11,56 a	86,09±9,85 a	88,40±10,83 a
MBIO 18	5,95±1,83 b	33,45±16,75 a	53,79±5,50 a	76,45±6,26 a	100,00±0,00 a
MBIO 19	1,05±0,55 c	12,97±3,15 c	59,44±32,89 a	89,75±10,08 a	89,02±8,29 a
MBIO 20	1,67±1,36 c	22,73±9,10 b	44,27±17,01 b	71,12±21,14 a	86,10±9,47 a
IBCB 425	1,25±0,17 c	41,67±20,56 a	54,92±24,54 a	75,97±8,01 a	90,34±7,94 a
C.V.	37,3 %	21,38 %	19,03 %	8,25 %	6,09 %

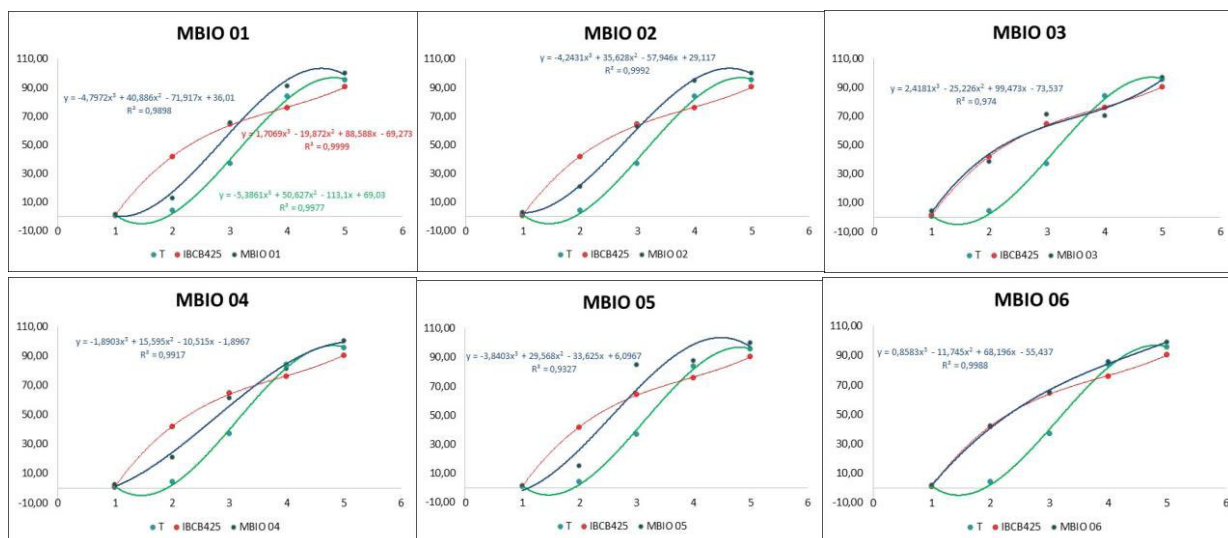
Médias (\pm IC-Intervalo de Confiança) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; CV- Coeficiente de Variação; HAE – Horas após exposição.

A Figura 28 mostra a evolução da patogenicidade de isolados de *Metarhizium* sp. a *C. flavipes* ao longo dos cinco dias de avaliação (24, 48, 72, 96 e 120HAE). As curvas de evolução da mortalidade representam equações que melhor se ajustaram aos dados proporcionando os maiores coeficientes de determinação (R^2). As Figuras 29, 30 e 31 apresentam a área abaixo da curva de evolução da mortalidade – AACEM a 48HAE para cada isolado. Observa-se na Figura 29 os cinco isolados que obtiveram área igual ou

abaixo da testemunha, quais sejam MBIO 19, MBIO 14, MBIO 01, MBIO 08 e MBIO 13. Já a Figura 30, para 72HAE os isolados menos patogênicos foram: MBIO 14, MBIO 08, MBIO 02, MBIO 10 e MBIO 13. Na Figura 31 de 120HAE, os isolados MBIO 08, MBIO 10, MBIO 14, MBIO 13 e MBIO 02 que obtiveram área abaixo da testemunha. Foi observado então que apenas 48HAE e 72HAE tiveram correspondência com seus respectivos tratamentos da Tabela 6.

Analisando então a evolução da patogenicidade e a compatibilidade dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. ao parasitoide *C. flavipes* em função do tempo, através da AACEM, pode-se concluir que os melhores momentos para seleção de isolados menos patogênicos e compatíveis com o agente de controle biológico *C. flavipes* encontram-se no intervalo de 48HAE a 72HAE, a exemplo do obtido para o parâmetro porcentagem de mortalidade (PM) da Tabela 6. Considerando então esses dois parâmetros como os mais adequados para selecionar isolados compatíveis, os isolados com menor patogenicidade ao parasitoide em 48HAE e 72HAE foram MBIO 01, MBIO 05, MBIO 11, MBIO 16, MBIO 19, MBIO 10, MBIO 13 e MBIO 20 sendo estes os isolados mais compatíveis com a *C. flavipes* e, portanto, os mais indicados para serem utilizados em programas de Manejo Integrado de Pragas - MIP. Por outro lado, os que apresentaram maior patogenicidade à vespa, desde as primeiras horas, foram: MBIO 03, MBIO 06, MBIO 07, MBIO 15 e MBIO 17. Desta forma, 72HAE foi escolhida para realização dos próximos experimentos.

Figura 28. Média da mortalidade de *C. flavipes* inoculadas com os 20 isolados de *Metarhizium* estudados nos dias após a inoculação em laboratório.



Continua

Continuação. Média da mortalidade de *C. flavipes* inoculadas com os isolados de *Metarhizium* estudados nos dias após a inoculação em laboratório.

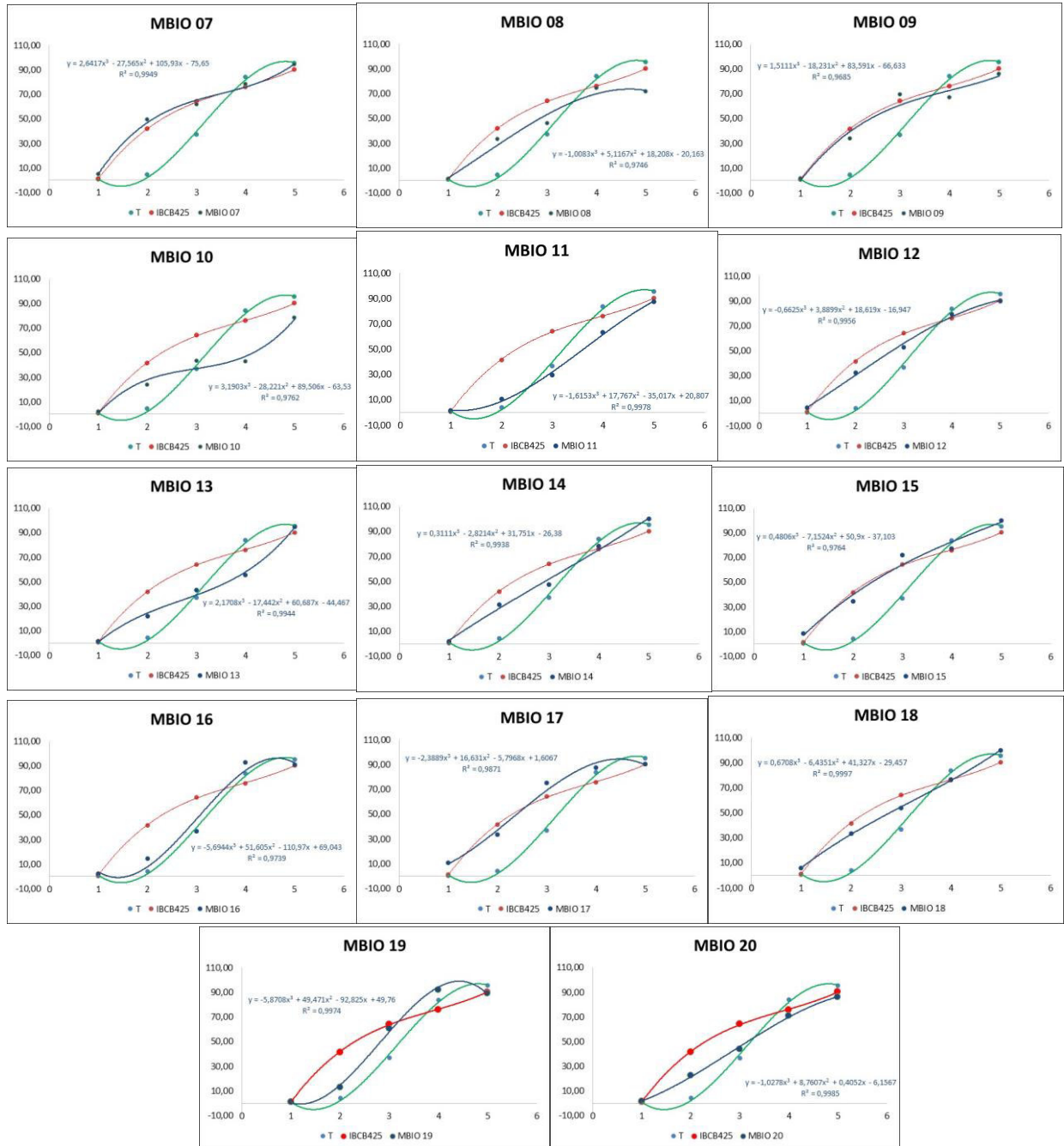


Figura 29. Área abaixo da curva de evolução da mortalidade – AACEM de cada isolado as 48HAE.

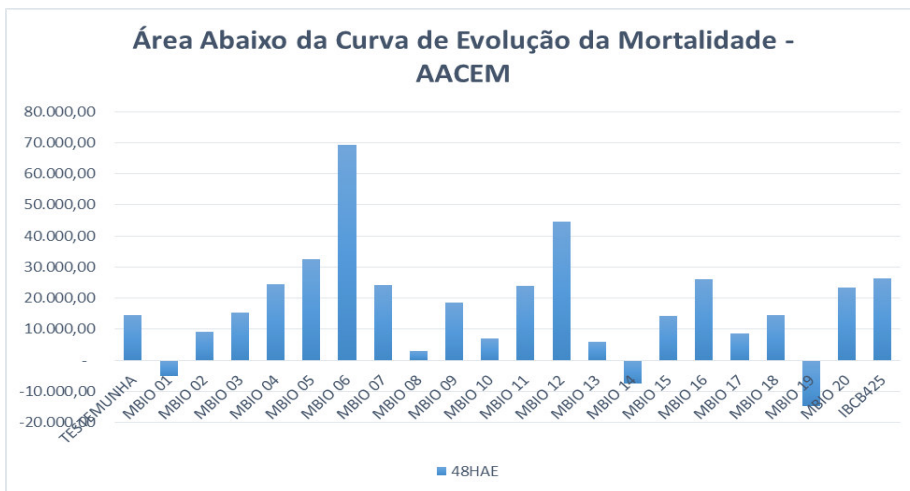


Figura 30. Área abaixo da curva de evolução da mortalidade – AACEM de cada isolado as 72HAE.

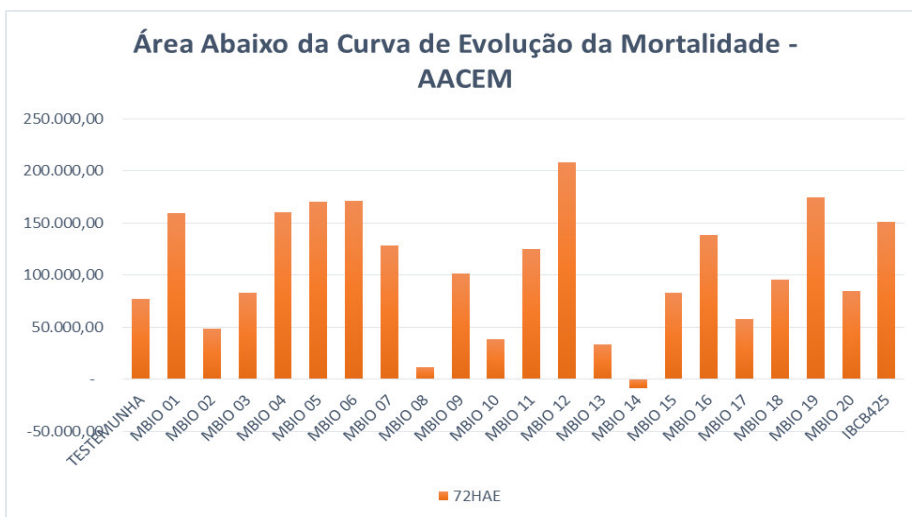
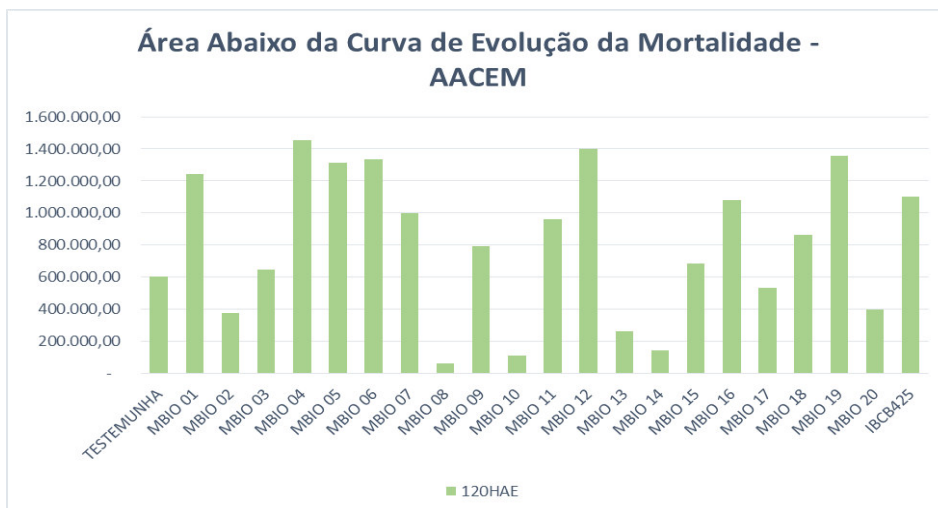


Figura 31. Área abaixo da curva de evolução da mortalidade – AACEM de cada isolado as 120HAE.



3.2 Avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. em *Cotesia flavipes* após 72HAE .

Observando-se a Tabela 7, referente ao primeiro experimento, foi possível notar uma variação de 29,60 a 84,75% de mortalidade confirmada, sendo que MBIO 11 e MBIO 05 se comportaram como o menos e o mais patogênico, respectivamente. Além do MBIO11, os isolados MBIO 08, MBIO 10, MBIO 12, MBIO 13, MBIO 14, MBIO 16 e MBIO 20 foram os menos patogênicos, todos com mortalidades confirmadas abaixo de 48%.

Tabela 7. Média da Porcentagem da Mortalidade de adultos de *Cotesia flavipes* de três experimentos após a exposição de esporos de vários isolados de *Metarhizium* spp. em laboratório por um período de 72 horas (HAE) em 25±2°C e 70±10%UR.

TRATAMENTO	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3	MÉDIA
"TESTEMUNHA"	36,94 b	62,25 d	48,50 g	48,86 c
MBIO 01	65,22 a	55,25 e	46,00 h	50,75 c
MBIO 02	63,13 a	74,00 a	66,75 a	67,36 a
MBIO 03	66,85 a	69,75 b	66,75 a	67,27 a
MBIO 04	61,22 a	70,25 b	67,25 a	66,75 a
MBIO 05	84,75 a	69,25 b	55,50 e	62,27 a
MBIO 06	64,68 a	64,00 d	51,50 f	55,78 b
MBIO 07	61,85 a	72,00 b	62,50 c	63,97 a
MBIO 08	46,37 b	74,25 a	68,25 a	65,60 a
MBIO 09	69,43 a	72,50 b	62,00 c	64,99 a
MBIO 10	43,37 b	67,75 c	59,00 d	57,85 b
MBIO 11	29,60 b	71,75 b	57,25 d	55,06 b
MBIO 12	52,73 b	67,00 c	57,75 d	58,46 b
MBIO 13	43,04 b	73,00 b	61,75 c	60,51 a
MBIO 14	47,52 b	68,00 c	59,50 d	58,92 b
MBIO 15	72,25 a	68,00 c	60,25 c	63,54 a
MBIO 16	37,02 b	65,00 d	56,50 d	54,67 b
MBIO 17	75,19 a	76,00 a	61,75 c	66,36 a
MBIO 18	53,79 a	71,75 b	62,25 c	62,43 a
MBIO 19	59,44 a	64,25 d	48,75 g	53,11 c
MBIO 20	44,27 b	73,00 b	63,75 b	62,04 a
"ICB425"	54,92 a	77,25 a	68,75 a	69,43 a
"ESALQ 1037"	59,00 a	76,75 a	61,75 c	65,50 a
C.V.	19,03 %	1,74 %	1,68 %	2,94 %

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade; CV- Coeficiente de Variação; HAE – Horas após exposição.

No segundo experimento (Tabela 7) a variação de mortalidade confirmada foi menor, de 55,25 a 76% para MBIO 01 e MBIO 17, respectivamente, sendo os isolados

MBIO 06, MBIO 12, MBIO 16 e MBIO 19, além do MBIO 01, considerados como os menos patogênicos com mortalidades confirmadas abaixo de 67%. No terceiro experimento (Tabela 7), a variação foi de 46,00 a 68,25% para MBIO 01 e MBIO 08 respectivamente, sendo um grupo bem distinto estatisticamente, sendo ainda menos patogênicos os isolados MBIO 05, MBIO 06 e MBIO 19 com mortalidades abaixo de 56%.

Após analisar a média dos três experimentos, dentre os 20 isolados testados, apenas 5 foram capazes de proporcionar índices de mortalidade confirmada iguais ou inferiores a 56%. Desta forma, este valor foi adotado como padrão no critério dos isolados mais compatíveis com o parasitoide *C. flavipes*, com bom potencial para serem utilizados em conjunto em programas de Manejo Integrado da broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis*. Os resultados obtidos não corroboram com Folegatti et al. (1990), que, avaliando a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* sobre adultos de *C. flavipes*, verificaram que o fungo causou mortalidade baixa. Resultado semelhante a esses autores também foi observado por Hayashida et al. (2012) que, testando altas concentrações do fungo *M. anisopliae* sobre adultos de *C. flavipes*, constataram baixa patogenicidade, demonstrando que há necessidade de estudos de seleção a nível de isolados mais detalhados dessa espécie.

As análises estatísticas dos isolados de *Metarhizium* spp. em relação à mortalidade confirmada causada em adultos de *C. flavipes* (Figuras 32 e 33), indicam que existem três grupos distintos de isolados. O primeiro grupo, composto por 14 isolados altamente patogênicos ao parasitoide, geraram mortalidade entre 60 e 70%; o segundo grupo, compreendendo 6 isolados, ocasionou mortalidade variando de 54 a 59%; o terceiro grupo, composto por apenas dois isolados, MBIO 1 e MBIO 19, e a testemunha, podem ser considerados não patogênicos ao parasitoide, pois apresentaram mortalidade confirmada de 48 a 53%, respectivamente, não diferindo estatisticamente da testemunha, sendo esses os isolados selecionados também no item 3.1 e de maior interesse nesse estudo.

Os cinco isolados que apresentaram menor patogenicidade nesse experimento foram os isolados MBIO 01, MBIO 19, MBIO 16, MBIO 11, MBIO 06 que corroboram com os resultados obtidos na atividade anterior 3.1 (MBIO 01, MBIO 05, MBIO 11, MBIO 16 e MBIO 19) que os isolados foram avaliados com relação a variação do tempo após exposição ao fungo.

Como pode ser observado na Tabela 7, os dois isolados de referência utilizados IBCB 425 e ESALQ 1037 foram patogênicos ao parasitoide, inserindo-se no grupo 1, que é o grupo dos isolados mais patogênicos. A liberação massal de *C. flavipes* e a aplicação de

M. anisopliae são comumente feitas pelas usinas sucroalcooleiras do Brasil, no entanto, há necessidade de avaliar os efeitos das interações entre estes organismos para otimização do controle, principalmente pelo fato do isolado de referência IBCB 425 ser o isolado liberado para registro de produtos fitossanitários e o mais utilizado no Brasil. (ALVES & LOPES, 2008). Além disso, IBCB 425 é o único isolado de referência autorizado para utilização em agricultura orgânica no Brasil (INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA SDA/SDC Nº 2, DE 12 DE JULHO DE 2013), sugerindo seja feita a indicação do MBIO 1 e MBIO 19 também como isolados de referência por futuras novas instruções normativas. O IBCB 425 é o isolado mais utilizado no Brasil, mas não é o mais compatível com *C. flavipes*, não podendo ocorrer liberações do parasitoide próximas a aplicação do fungo.

Ao longo dos três experimentos que compuseram o teste de seleção de isolados mais compatíveis a *C. flavipes*, foram observadas variações nos índices de mortalidade confirmadas entre os tratamentos. Para Alves (1998) esta variação na patogenicidade é observada com frequência em testes de seleção, podendo estar associada a fatores como baixa virulência de alguns isolados, especificidade, tolerância do hospedeiro, entre outros aspectos.

Ao término das avaliações, foi possível constatar que a maioria dos 20 isolados do fungo *Metarhizium* spp. apresentaram algum grau de patogenicidade à *C. flavipes*, destacando a importância dos experimentos de seleção para obtenção de isolados menos patogênicos (Tabela 7).

Com a média dos três experimentos foi possível a seleção de dois isolados não patogênicos ao parasitoide *Cotesia flavipes*, o MBIO 01 e o MBIO 19, com resultados semelhantes ao da testemunha. Portanto, os experimentos de seleção são imprescindíveis para melhorar o controle biológico de pragas, principalmente quando o objetivo é utilizar fungos entomopatogênicos associados a agentes de controle biológico em programas de Manejo Integrado de Pragas - MIP, pois foi demonstrado nesse estudo que a maioria dos isolados utilizados não eram compatíveis com o agente biológico, fazendo-se necessária a seleção para identificar isolados compatíveis. Isto sugere que os dois métodos de controle biológico podem atuar sinergicamente na gestão de *D. saccharalis* em canaviais se for realizado estudos preliminares criteriosos.

Figura 32. Percentual de mortalidade dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. ao parasitoide *Cotesia flavipes* representados em três grupos de acordo com o grau da patogenicidade.

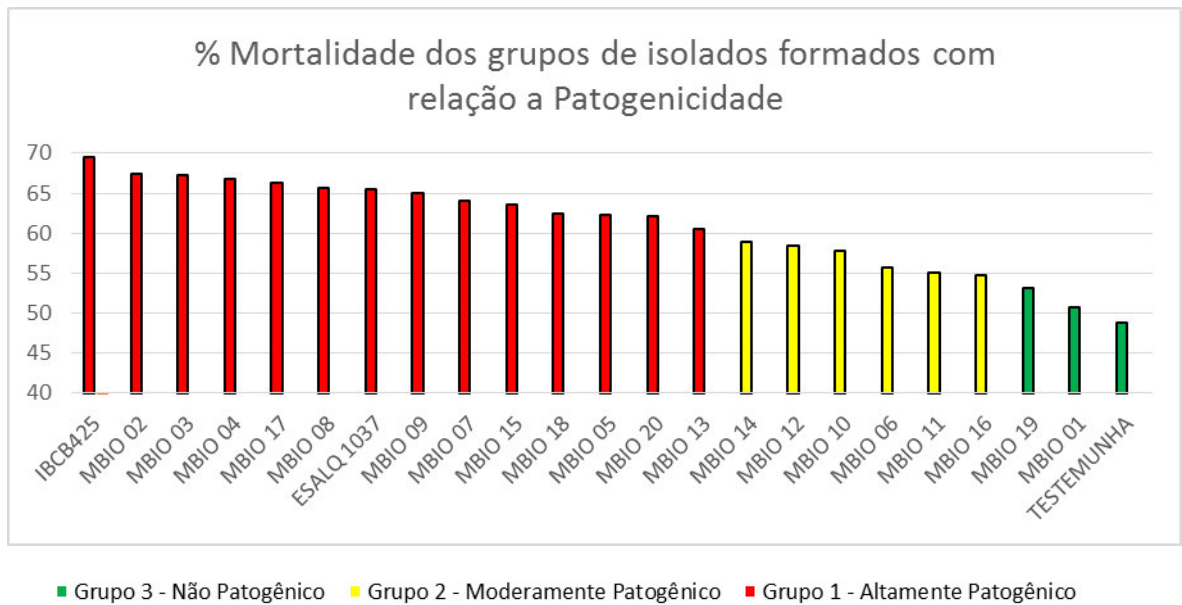
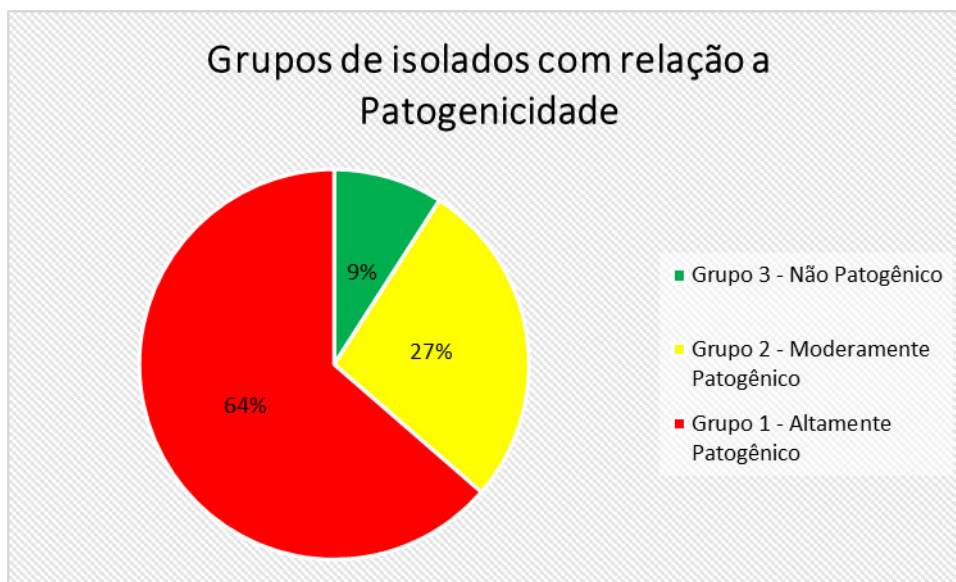


Figura 33. Proporção das médias de patogenicidade dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. a *Cotesia flavipes*, formando três grupos de acordo com o grau da patogenicidade.



CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE
Metarhizium spp. UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES ITS
(Espaçador Transcrito Interno) E EF1- α (Fator de Elongação 1-alfa)

1-INTRODUÇÃO

Estima-se que as vendas de fungos entomopatogênicos no mercado latino-americano é de aproximadamente US\$ 20 milhões por ano. No Brasil, no ano de 1998, as vendas chegaram a US\$ 1 milhão, com potencial estimado em US\$ 140 milhões. Estimativas mostraram que, nos últimos quinze anos, o mercado de fungos entomopatogênicos cresceu significativamente no Brasil, fechando o ano de 2008 com um faturamento de aproximadamente US\$ 10 milhões (ALVES & LOPES, 2008).

Mundialmente, em 2010, existiam cerca de 1400 produtos (biopesticida) no mercado, sendo que esses produtos representam apenas 2,5 % do mercado de pesticidas totais (BAILEY, 2010). Marrone (2007) estimou que o setor de biopesticidas terá uma taxa anual composta de cinco anos de crescimento de 16 % (em comparação com 3% de pesticidas sintéticos), que deverá produzir um mercado global de \$ 10 bilhões até 2017. No entanto, o mercado pode precisar aumentar substancialmente mais do que isso, se os biopesticidas desempenharem um papel pleno na redução da nossa dependência excessiva de pesticidas químicos sintéticos.

Entretanto, mesmo com um mercado potencial elevado, Loureiro (2004) atenta para o fato de existir uma limitação no desenvolvimento e comercialização de produtos microbianos, pela falta de caracterização e padronização da linhagem selecionada, visando sua identidade durante o processo produtivo. Cada vez mais, o uso de defensivos agrícolas à base de ativos biológicos apresenta-se como alternativa viável do ponto de vista técnico e econômico para o controle de pragas na agricultura. Nos últimos anos, com o salto verificado na produtividade, o Brasil consolidou-se como potência agrícola. Grandes avanços tecnológicos foram alcançados com o uso de fertilizantes mais eficientes, sementes melhoradas, máquinas de alto rendimento e novas moléculas químicas utilizadas no combate a doenças e insetos. Torna-se necessário, agora, incrementar o uso dos ativos biológicos, cuja produção e o uso ainda carecem de uma regulamentação adequada. O processo de obtenção de registro de produtos biológicos evoluiu, em alguns aspectos, por meio da legislação específica direcionada para a agricultura orgânica, mas apenas isso não é suficiente. Apesar de já contar com 51 empresas produtoras e ter 118 produtos comerciais no mercado, o setor ainda não conta com regulamentação oficial, o que significa que há produtos no mercado cuja qualidade e eficácia não são comprovados. É necessário evoluir nas técnicas e criar parâmetros de auditorias para os fabricantes, consumidores e órgãos de fiscalização (FARIA, 2015). Espera-se, assim, que as técnicas

moleculares venham contribuir com o controle biológico de pragas, por agilizarem os processos de identificação de isolados altamente virulentos, com alta adaptabilidade e, portanto, de alta performance, podendo fornecer, com maior rapidez, mais uma opção ecologicamente correta e menos impactante tanto ao trabalhador rural quanto ao meio ambiente na manutenção do equilíbrio entre populações de insetos-pragas e agentes de controle biológico (ZAPPELLINI 2010). Marcadores moleculares do tipo microssatélites podem ser usados para rastrear o destino de um agente de controle biológico. Este tem sido utilizado para *Beauveria brongniartii* na Suíça, onde foram amostradas áreas tratadas vários anos após aplicação para avaliar se o agente de controle biológico tinha se estabelecido (ENKERLI et al., 2005).

Para avaliar fungos entomopatogênicos como agentes de biocontrole, é importante investigar variações genéticas entre os isolados e suas capacidades de distribuição e persistência e do potencial de realizar permuta gênica dentro de uma mesma população e com outras populações. Esses dados não só complementaríamos informações biológicas fundamentais, mas também contribuiríamos em fazer cumprir as exigências para o registro de produtos biológicos. Além disso, esse tipo de investigação permite uma identificação pontual de isolados, favorecendo o melhor monitoramento da persistência e do comportamento de um isolado introduzido no ambiente para finalidade de controle (WANG et al., 2005).

Técnicas moleculares desenvolvidas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como o sequenciamento de DNA, têm sido ferramentas úteis na identificação de vários organismos, dentre eles os fungos. Entre os marcadores moleculares utilizados para este propósito destaca-se o sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) que separa os genes 18S e 28S do rDNA e que pode ser amplificada com primers específicos ancorados nessas duas regiões. Essa região é altamente conservada intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção ao nível específico (FUNGARO, 2000). Por outro lado, em estudos mais recentes, a taxonomia do Complexo *M. anisopliae* foi revista com base em uma filogenia nuclear multilocus (BISCHOFF et al., 2009) e a região 5' do gene para o fator de alongamento da tradução (5'-TEF) demonstrou ser o melhor locus para a identificação molecular desta espécie.

Dentro desta realidade, foi identificada a necessidade do desenvolvimento de uma ferramenta que pudesse auxiliar os fabricantes, produtores e, principalmente, os órgãos de fiscalização e registro dos produtos biológicos, com informações mais específicas e

precisas dos agentes utilizados nas formulações dos produtos e ainda garantir certificação através de parâmetros definidos, onde os usuários conectados pudessem tratar essa questão com maior clareza. A fim de controlar a estabilidade do isolado durante a produção e / ou rastrear o uso de isolados específicos, biofábricas e governos precisa de técnicas e abordagens para monitorar a identidade genética de isolados utilizados nos biopesticidas. No entanto, ainda permanece a necessidade de uma plataforma on-line com um banco de dados e software para receber, organizar e analisar dados moleculares de diferentes pesquisadores e usuários em diferentes partes do mundo (FAGUNDES et al., 2014).

Baseado nessas informações, o presente estudo buscou identificar 22 isolados de *Metarhizium* sp., através do sequenciamento de nucleotídeos da região fator de elongação 1-alfa (EF1- α) (Figura 34) e a região espaçadora interna transcrita (ITS) (Figura 35), destes isolados pré-selecionados pela alta performance e baixa patogenicidade nas etapas anteriores. Esses marcadores foram empregados para permitir uma delimitação mais robusta das espécies por análise multilocus e consequentemente a reconstrução filogenética do complexo *M. anisopliae*. As análises buscaram investigar também a filogenia e a diversidade genética dos isolados brasileiros selecionados e avaliar a sua relação com a comunidade mais ampla de *Metarhizium* pelo Brasil. Desta forma, os dados provenientes poderão contribuir com dados significantes para o desenvolvimento dessas ferramentas de identificação e futuramente até uma plataforma on-line que auxiliará a profissionalização do controle biológico no Brasil.

Figura 34. Esquema e mapa das posições dos primers EF1-a (RENHER, 2005).

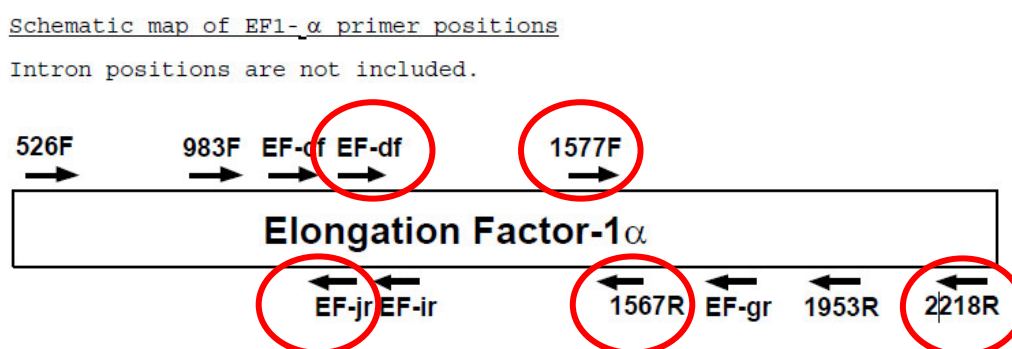
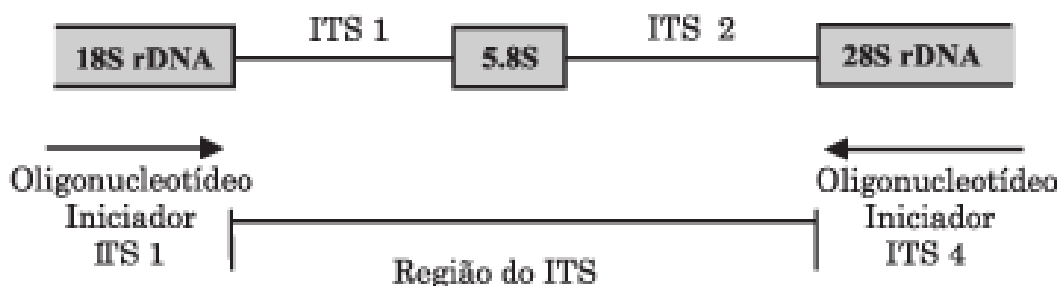


Figura 35. Esquema da região do rDNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2 (LUPATINI, 2008).



2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de execução dos experimentos.

A caracterização molecular dos isolados foi realizada em instituições diferentes. O crescimento dos isolados fúngicos foram realizados no Laboratório de Produção de Agentes Biológicos – Biofábrica (Bioenergia do Brasil S/A), localizado na cidade de Lucélia – São Paulo. As extrações de DNA foram realizadas no Departamento de Biologia, Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de São José do Rio Preto – SP. O local que foi realizado o sequenciamento das regiões ITS e EF1-a foi no Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional da ESALQ/USP e as análises de Bioinformática na empresa Mycofinder Genômica e Controle Biológico Ltda.

2.2 Isolados estudados.

Vinte e dois isolados de *Metarhizium* sp. de alta performance para virulência e esporulação pré-selecionados por Bovi (2012) e confirmados pelo presente estudo, dois isolados de referência do Instituto Biológico, o IBCB 425 e ESALQ 1037 (Tabela 1), e ainda dois isolados do CENARGEM CG 439 e CG 645 foram utilizados. Os isolados são originários de diferentes regiões geográficas brasileiras e de hospedeiros ou substratos. Essas informações estão disponíveis na Tabela 1.

2.3 Extração e Quantificação de DNA

A fim de se obter quantidades suficientes de micélio para a extração de DNA, os isolados de *Metarhizium* sp., foram repicados para frascos de vidro transparentes, de 110 mL, contendo meio de cultura líquido BD (batata-dextrose) e aveia respectivamente, nos quais os fungos se desenvolveram por cerca de 10 dias. Para a separação do micélio do meio de cultura, foram utilizadas peneiras de pequena trama que permitem filtragem, retendo o micélio e dispensando o meio restante. Ainda na peneira, o micélio foi lavado com água destilada, escorrido e colocado para secar em placas de Petri limpas, em temperatura ambiente, por cerca de 12 horas. Posteriormente, o micélio seco foi macerado com nitrogênio líquido até a formação de um pó, que foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL.

Para extração de DNA foi utilizado o protocolo de Kuramae-Izioka (1997) com modificações, que permitiu a obtenção de DNA em maior quantidade e qualidade. Assim, foram acrescentados 800 µL de tampão de extração [Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 100 mM pH 8.0 e SDS 0,5% (p/v)] a um tubo eppendorf de 2,0 mL contendo 0,1 g de micélio macerado. Após agitados, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 45 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos gentilmente. Posteriormente a esse período, foram acrescentados 400 µL de acetato de potássio 5 M. Misturou-se a solução por inversão e incubou-se no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Após as amostras terem sido centrifugadas a 15294 x g por 10 minutos, a 15°C, o sobrenadante foi transferido para tubos novos, sendo acrescentado a este 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução foi misturada por inversão durante dois minutos e centrifugou-se novamente a 15294 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e, novamente, tratado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) sob as mesmas condições. Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para tubos novos com cuidado para não tocar na interface inferior e acrescentou-se 15 µL de RNase (10 mg/mL). A fim de possibilitar a ação da RNase os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 1000 µL de etanol absoluto gelado e a solução, após ser misturada gentilmente, foi levada ao freezer -20°C overnight.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 15294 x g por 20 minutos. A fase líquida foi descartada e o pellet foi lavado com 1000 µL de etanol

70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o pellet foi colocado para secar em um concentrador à vácuo (Eppendorf) a 30°C por 5 minutos. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) por 24 horas à 4°C e posteriormente o material foi armazenado a -20°C até uso. A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-100 (Uniscience), medindo-se a absorvância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). A relação da absorvância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, que se estiver no intervalo de 1,8 a 2,0 caracteriza um DNA de boa qualidade. As amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas) para verificação da qualidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC 1000 (BioRad).

2.4 Amplificação e sequenciamento do gene 5'EF1- α e da região ITS dos isolados de *Metarhizium* spp. para Identificação Taxonômica, Filogenia e Diversidade Genética

Para a amplificação de fragmentos de DNAs, em reações de PCR, foram utilizadas as regiões universais: região Espaçadora Interna Transcrita (ITS) e Fator de Elongação 1-alfa (EF1- α). A região 5' EF-1 α região do íntron e a região espaçadora interna transcrita (ITS) foram amplificadas e sequenciadas para todos os isolados de *Metarhizium* para obter diferenciação entre as espécies de *Metarhizium* selecionadas e, assim confirmar sua classificação filogenética com a melhor resolução de dados. Os iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento da região 5' EF-1 α região do íntron EF2F (5'-GGAGGACAAGACTCACATCAACG) forward e EFjR (5'-TGYTCNCGRGTYTGNCRCYTT) reverse segundo Rehner e Buckley (2005). Os primers usados para a região ITS1 e ITS2 foram TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC) forward e AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT) segundo White et al. (1990).

Os procedimentos para amplificação e sequenciamento foram os mesmos usados por (RHENER & BUCKLEY, 2005). As amplificações por PCR foram realizadas num volume total de 50 uL, que incluiu 25 uL de Taq DNA pol (JumpStart REady Mix Taq - Sigma), 10 pmol de cada um dos iniciadores de amplificação, 20 ng de DNA genômico/ul

e água ultrapura estéril. PCR para ambos os loci foi realizada utilizando o procedimento de PCR touchdown (DON et al., 1991). Amplificações por Touchdown PCR foram iniciadas com uma desnaturação de 2 min a 94°C. A temperatura de anelamento na primeira amplificação do ciclo foi de 66° C, que foi subsequentemente reduzida 1°C por ciclo durante os 9 ciclos. Um adicional de 36 ciclos de amplificação foi então realizado, cada um consistindo em 30s de desnaturação a 94°C, 30s de anelamento a 56°C e uma extensão de 1 min a 72°C, concluindo com uma incubação de 10 minutos a 72°C.

As bandas de fragmentos de DNA resultantes da amplificação por PCR foram visualizadas e fotografadas sob luz UV em gel de agarose a 1,5%, corado com Gel Red (Biotium). Todos os produtos de PCR que se apresentaram amplificados de maneira satisfatórios foram purificados pelo sistema Agencourt® AMPure® PCR Purification (Beckman Coulter) de esferas paramagnéticas com o volume recomendado do Agencourt AMPure XP (beads) para o volume de amostra, homogenizando bem para as “beads” se ligarem aos produtos de amplificados. Tendo em vista que esse sistema de purificação tem como objetivo a retirada de resíduos de até cem pares de bases, do produto amplificado, esse processo foi realizado para a eliminação dos iniciadores remanescentes da PCR. Após a purificação foi realizado novamente a visualização das bandas agora purificadas sob luz UV em gel de agarose a 1,5%, corado com Gel Red (Biotium) para quantificação e verificação da qualidade dessas bandas.

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit ABI BigDye 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando 0,5ul de BigDye diluída em 1,5 uL de tampão de diluição (400 mM Tris / HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 5 pmol de primer, 75-100ng purificado em gel de modelo de PCR num volume total de 5 uL. O sequenciamento foi realizado em microplacas de 96 poços de acordo com as instruções do fabricante, com exceção de que o número total de ciclos foi aumentado para 35. Os produtos do sequenciamento foram separados dos componentes residuais da reação por precipitação com etanol. As reações de sequenciamento foram suspensas em formamida deionizada, aquecendo o desnaturado e executado em um Analisador Automático ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.5 Análise Filogenética

As sequências foram visualizadas no programa Geneious R9 (criado por Biomatters, disponível em <http://www.geneious.com/>). As sequências obtidas de ITS e EF1 foram alinhadas automaticamente através do programa Clustal Omega (homepage Clustal) (SIEVERS et al., 2011), com os parâmetros padrão propostos pelos autores. Os alinhamentos foram refinados manualmente no programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997).

As árvores filogenéticas foram construídas a partir das sequências obtidas para o gene EF e para a região ITS. As árvores filogenéticas foram geradas através do programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) empregando-se o método de Neighbor-Joining (NJ) como critério para distância e avaliação da reprodutibilidade da topologia das árvores através de bootstrap com 1000 repetições.

Após a edição, as sequências obtidas foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Os acessos que apresentaram a maior porcentagem de similaridade/identidade com a sequência em estudo e acessos contrastantes com menor porcentagem de similaridade/identidade, considerando a melhor combinação de “score” e “e-value” foram considerados para formar a raiz da árvore filogenética. Dessa forma, foram construídas matrizes de dados das regiões nucleares para as análises filogenéticas considerando os isolados de referência taxonomicamente autenticados para as sete espécies do complexo *Metarhizium anisopliae* atualmente reconhecidas (BISCHOFF et al., 2009), incluindo *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. guizhouense*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. pingshaense* e *M. robertsii*.

3.3.4 Caracterização e Genotipagem dos Microssatélites

A caracterização dos locos microssatélites foi realizada com 8 marcadores SSR polimórficos da dissertação de mestrado de Bovi (2012). Estes locos foram utilizados para a genotipagem do fungo visando a caracterização genética de 12 isolados de *Metarhizium* spp selecionados posteriormente à dissertação de mestrado e utilizados nesta tese.

As reações de PCR foram realizadas separadas para cada loco. A amplificação dos locos SSRs, foram realizadas a partir de uma reação geral descrita a seguir: 6 μ L de reação contendo 10ng DNA genômico, 200 μ M de cada dNTP, Taq DNA pol (JumpStart Ready Mix Taq - Sigma), 0,20 μ M de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e água ultrapura estéril. O componente *Foward* de cada par de *primers* foi marcado na sua extremidade 5' com um

fluorocromo. As condições de termociclagem foram: Lid de 105°C, um ciclo de 94°C por 5 min., 35 ciclos de 94°C por 1min., Temperatura de pareamento do primer por 1min, 72°C por 1min e 30 seg. um ciclo final de 72°C por 7 min e hold a 4°C.

O produto destas reações foi diluído (1 µL de reação para 5 µL de água ultrapura estéril), para montagem de multiplex com 2 ou 3 amplificadores de locos distintos, sendo 1 µL de cada amplificado diluído, 9 µL de formamida Hi Di, 0,65 µL de água ultrapura estéril e 0,35 µL do marcador interno fluorescente (ROX). O marcador interno fluorescente utilizado nestas reações foi desenvolvido por Brondani e Grattapaglia (2001). Os multiplex foram desnaturados a 94°C por 5 minutos, e em seguida analisados por eletroforese capilar para detecção dos alelos por fluorescência, em analisador automático de fragmentos ABI Prism 3100 (Applied Biosystem).

A detecção e a estimativa do tamanho de alelos em pares de bases foram realizadas com o uso do *software ABI Prism GeneScan* versão 3.7 (Applied Biosystems). Em seguida, os valores foram importados para o *software ABI Prism Genotyper* versão 2.0 NT (Applied Biosystems) para filtragem dos picos e interpretação dos dados, definindo o genótipo de cada indivíduo.

A estruturação da variabilidade foi visualizada através de dendrogramas, construídos pela matriz de distâncias genéticas calculada usando o Coeficiente de Similaridade de Jacard e pelo critério de agrupamento UPGMA (método de média aritmética não ponderada) no programa PAST (HAMMER et al., 2001). Marcadores SSR comportam-se como marcadores co-dominantes, desta forma, foi estabelecida uma matriz de similaridade entre os isolados, sendo pontuados para a presença (1) ou ausência (0) de homólogos para todos os isolados. A estabilidade dos agrupamentos foi testada através de 10.000 reamostragens bootstrap.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

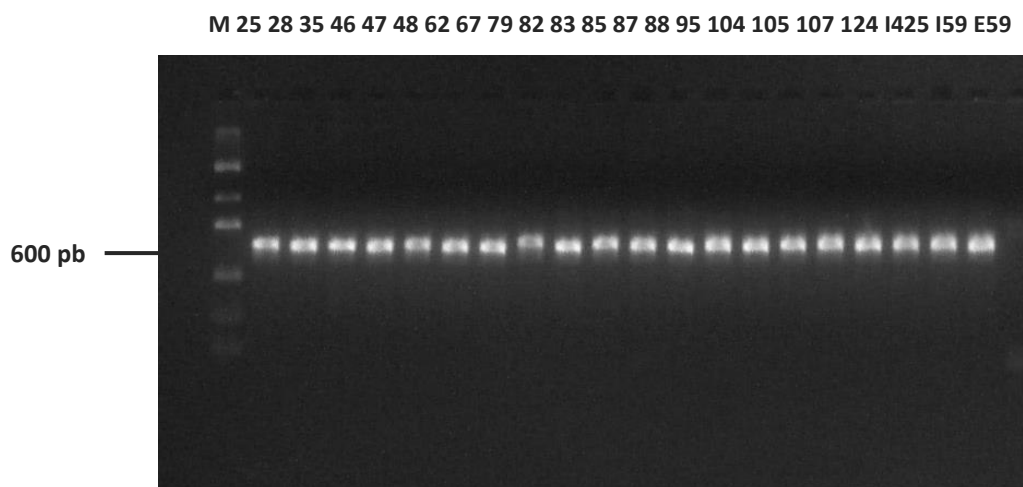
3.1 Diversidade, designação taxonômica e filogenia dos isolados de *Metarhizium*

3.1.1 Análises Filogenéticas das Sequências ITS

O sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 foi realizado para obter diferenciação entre as espécies de *Metarhizium* analisadas e assim, confirmar sua classificação. A partir

de todos os isolados analisados foi amplificado um fragmento de aproximadamente 600pb, conforme esperado (Figura 36). A análise envolveu 64 sequências de nucleótidos. Todas as posições com cobertura inferior a 95% foram eliminadas. Isto é, menos de 5% de lacunas de alinhamento, dados faltantes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 457 posições no conjunto de dados final.

Figura 36: Padrão de amplificação do gene ITS dos isolados de *Metarhizium* spp., observado em gel de agarose. M: Marcador de peso molecular 100pb Ladder DNAMarker (100-2000pb), com indicadores de tamanho, em pares de base.



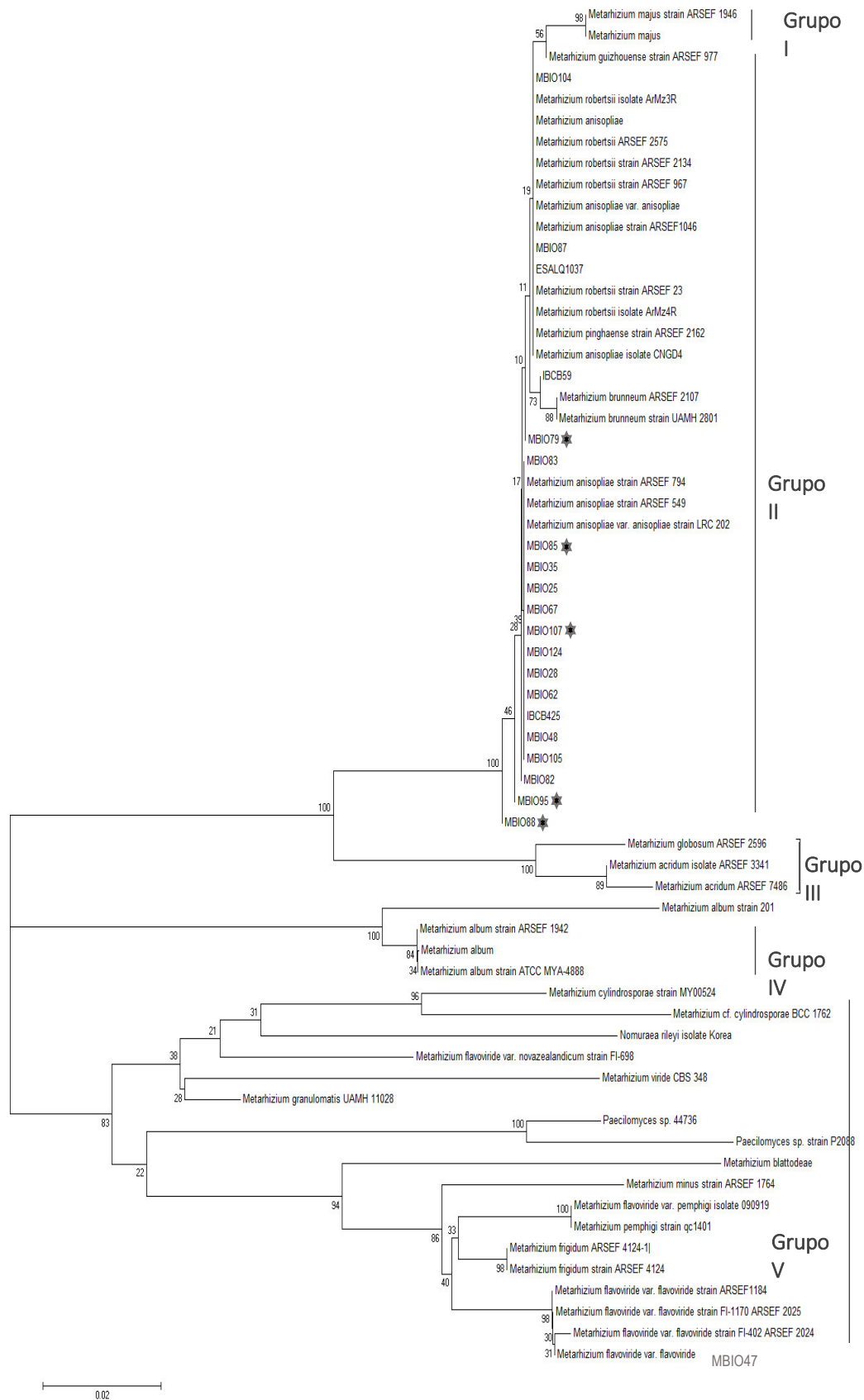
As sequências obtidas, correspondentes a região ITS1-5,8S-ITS2, foram alinhadas e comparadas com sequências conhecidas (BLAST). A análise filogenética destas sequências (Figura 37) revelou agrupamentos que alocaram os isolados pesquisados neste estudo em apenas dois grupos (II e V). A árvore filogenética obtida revelou cinco grupos muito distintos: o grupo I compreendeu a espécie *Metarhizium majus*; o grupo II agrupou as espécies de *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertssi*, *Metarhizium piganhaense* com 100% de similaridade entre si e *Metarhizium brunneum* e *Metarhizium guizhouense* ficaram mais distantes, porém ainda no mesmo grupo. Praticamente todos os isolados se agruparam neste grupo, sendo que os isolados M 83, 85, 35, 25, 67, 107, 124, 28, 62, 48, 105 e IBCB 425 apresentaram 100% de similaridade entre si e com *M. anisopliae*, o 88 e 95 com 25% e 45% de similaridade com esse mesmo grupo de isolados, o IBCB 59 ficou agrupado com os isolados de *M. brunneum* e o restante dos isolados não teve boa definição, pois ficaram entre duas espécies: o grupo III ficou representado pelas espécies *Metarhizium globosum* e *Metarhizium acridum*; o grupo IV ficou composto pela espécie *Metarhizium album*; e o grupo V foram agrupadas as espécies de *Metarhizium flavoviride*,

Metazhium pemphigi, *Metazhium frigidum*, *Metazhium minus* e *Metazhium blattodeae* , onde o isolado M 47 se agrupou (Figura 37).

As sequências geradas para a região ITS revelaram uma diversidade total de oito haplótipos dentre os 22 isolados pesquisados neste estudo. A análise de Neighbor Joining resultou em cinco grupos terminais, sendo que os isolados estudados se agruparam junto as espécies de *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. piganhaense*, *M. brunneum* e *M. guizhouense*, ou seja, ITS não teve uma boa resolução para definir as espécies, pois não conseguiu separar as espécies muito próximas, sendo que se agruparam na mesma clade e os isolados também ficaram nesse grupo e entre todas essas espécies, não podendo então ser definida e identificada a espécie de cada isolado.

Aparentemente, sequências correspondentes ao DNA ribossômico proporcionam uma boa resolução para diferenciar gêneros e espécies de fungos entomopatogênicos (SOSA-GÓMEZ et al., 2008). De maneira geral, para fungos, tem sido proposta a região ITS (internal transcribed spacer) como potencial para ser usada como barcoding (SEIFERT, 2009; <http://www.fungalbarcoding.org/>). Porém, dependendo do nível taxonômico estudado, outros genes ou regiões que proporcionam uma melhor resolução interespecífica podem ser utilizados, tais como o fator de alongação 1- α (EF-1a) nas espécies de *Metarhizium* (BISCHOFF et al., 2009).

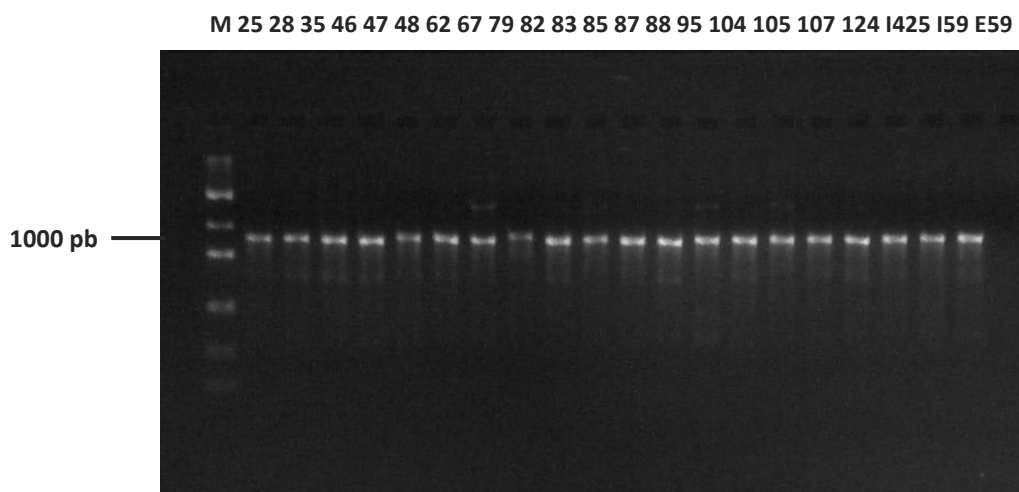
Figura 37. Árvore filogenética da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos 22 isolados de *Metarhizium* pré-selecionados estudados no presente trabalho com as sequências de referência do GeneBank com o número de acesso indicado. O método utilizado para a construção da árvore foi Neighbor-Joining sendo as distâncias evolutivas calculadas utilizando o método de Tamura-Nei. A confiança foi confirmada com 1000 repetições de bootstrap.



3.1.2 Análises Filogenéticas das Sequências 5' EF1- α

O sequenciamento da região 5'EF1- α foi realizado para obter a identificação e diferenciação entre as espécies de *Metarhizium* analisadas e assim, confirmar sua classificação. Também foi utilizado para complementar, comparar e confrontar com os dados da região ITS para obter uma melhor resolução e consistência dos dados. A partir de todos os isolados analisados foi amplificado um fragmento de aproximadamente 1000pb, conforme esperado (Figura 38). A análise envolveu 105 sequências de nucleótidos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências. Houve um total de 809 posições no conjunto de dados final.

Figura 38: Padrão de amplificação do gene EF1- α dos isolados de *Metarhizium* spp., observado em gel de agarose. M: Marcador de peso molecular 100pb Ladder DNAMarker (100-2000pb), com indicadores de tamanho, em pares de base.



As sequências obtidas, correspondentes a região 5'EF1- α , foram alinhadas e comparadas com sequências conhecidas (BLAST). Espécies mais distantes foram acrescentadas ao alinhamento para formar um outgroup, facilitando assim o alinhamento das sequências e reforçando a confiança. A análise filogenética destas sequências (Figura 39), revelou agrupamentos que identificaram os isolados analisados em quatro grupos distintos, confirmando a identidade taxonômica da maioria dos isolados de *Metarhizium* utilizados neste trabalho.

A árvore filogenética obtida teve boa resolução, pois conseguiu agrupar espécie com espécie e separar espécies muito próximas com bootstrap consistente e com alto valor de suporte para cada nó, revelando 11 grupos de diferentes espécies, sendo: o grupo I - *Metarhizium anisopliae*; grupo II - *Metarhizium piganhaense*; grupo III - *Metarhizium*

robertssi; grupo IV - *Metarhizium brunneum*; grupo V - *Metarhizium majus*; grupo VI - *Metarhizium taii*; grupo VII - *Metarhizium guizhouense*; grupo VIII - *Metarhizium lepidiotae*; grupo IX - *Metarhizium acridum*, grupo X - *Metazhium frigidum* e grupo XI - *Metazhium flavoviride*, ao contrário dos resultados obtido com ITS, que não conseguiu resolver as espécies muito próximas e agrupou todas em um único grupo (Figura 37).

Desta forma, a análise de Neighbor Joining resultou nestes 11 grupos terminais, sendo que os isolados estudados se agruparam junto as espécies de *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. brunneum* e *M. flavoviride*. A identificação por sequenciamento de 5' EF1- α demonstrou que *M. anisopliae* foi a espécie de *Metarhizium* mais frequente entre os isolados selecionados que compreenderam 73% de todos eles, sendo os isolados M 62, 124, 35, 25, 28, 48, 67, 105, 104, 87, 83, 82, 46 e os isolados de referência IBCB 425, IBCB 59 e ESALQ 1037 classificados então como *M. anisopliae*, seguido por 18% de *M. robertssi* com os isolados M 85, 88, 79 e 107, 5% de *M. brunneum* com o isolado M 95 e 5% de *M. flavoviride* com o isolado M 47 (Tabela 9). Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes ao de Rezende (2015), que também utilizando isolados brasileiros, ao estudar as sequências obtidas com 5' EF1- α , situou os 96 isolados de *Metarhizium* entre três espécies, em *M. anisopliae*, *M. robertssi* e *M. majus/M. guizhouense*, sendo que a espécie *M. anisopliae* também foi a mais abundante, pois compreendeu 79,2% de todos os isolados.

Os resultados ainda demonstraram que essa espécie considerando a abrangência geográfica, a variedade de habitats e a diversidade de hospedeiros e solos pesquisados sugerem que *M. anisopliae* podem ser a linhagem predominante em insetos terrestres nos diversos biomas brasileiros. Também foi isolado de solo, demonstrando que esse entomopatógeno também está presente nesse nicho. Concluíram ainda que representantes brasileiros de *M. robertssi*, possivelmente, estão ecologicamente mais restritos ao solo, explicando a incapacidade de isolar essa linhagem diretamente de insetos terrestres. Segundo REZENDE, 2015, nenhum *M. robertssi* do Brasil, explorados em estudos de biodiversidade, foi isolado a partir de insetos naturalmente infectados, porém, diz que há relatos de que alguns isolados brasileiros provenientes de insetos foram depositados na coleção ARSEF. Todos os isolados de *M. robertssi* estudados no presente trabalho foram isolados de solos de cana-de-açúcar, com exceção do isolado M107 que foi isolado de inseto (*Mahanarva fimbriolata*) parasitado, podendo ser explicado pelo fato que o inseto foi encontrado e coletado após um experimento com aplicação de inseticida, o que pode ter deixado o inseto bem vulnerável e facilitado o ataque dessa linhagem de solo.

As espécies *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. brunneum* e *M. flavoviride* são grupos monofiléticos com alto suporte de bootstrap para cada nó, 99, 73, 99 e 97% respectivamente, porém apenas *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. brunneum* compartilham um ancestral comum exclusivo, mostrando que *M. flavoviride* é bem mais distante. Com base numa filogenia de DNAr ITS1-5.8S-ITS2, Driver et al (2000) determinaram que o complexo de *M. anisopliae* é monofilético o que apoia os resultados obtidos neste trabalho. Ambas as espécies incluem múltiplas divisões que correspondem aos haplótipos intra-específicos observados na filogenia baseada na região 5' EF1- α . As sequências geradas para a região 5' EF1- α revelou uma diversidade total de 13 haplótipos dentre os 22 isolados pesquisados neste estudo, sendo nove grupos de haplótipos pertencentes a *M. anisopliae*, sendo que sete grupos são apoiados por sequências de referência obtidas no BLAST, pois apresentam sequência idênticas e dois novos haplótipos o M35 que se encontra sozinho e o grupo M 67, 105 e 104 que se referem a um haplotipo regional, pois esses isolados foram coletados de solos de cidades próximas do interior de São Paulo. *M. robertssi* possui dois haplótipos, um com sequências idênticas ao isolado ARSEF 4739 e o outro também como novo haplotipo. *M. brunneum* e *M. flavoviride* possuem apenas um haplótipo cada, sendo o M95 idêntico as sequências de ARSEF 4152 e 4179 e M47 como novo haplótipo. Os resultados demonstraram uma diversidade bem alta entre os isolados, que pode ser explicada pelo fato dos isolados selecionados do presente estudo já virem de uma seleção de indivíduos bem diferentes, gerando assim uma alta diversidade intra-específica entre eles. Os resultados de Steinwender et al. (2014) corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, pois suas análises de sequências de 5' EF1- α revelaram uma alta diversidade entre seus isolados, um total de sete haplótipos de sequências distintas entre os 12 genótipos multilocus da linhagem *M. anisopliae* do agroecossistema também pré-selecionados e por marcadores microssatélites (STEINWENDER et al.2014).

Essa diversidade dos isolados estudados pode ser observada até nas colônias, pois demonstram a grande diversidade morfológica dos isolados de *Metarhizium* ssp. Cada isolado do complexo *M. anisopliae* pertencente à Micoteca teve sua morfologia caracterizada, além de ser registrada uma fotografia representativa da colônia de cada isolado (Figura 40) para a observação dessa variabilidade fenotípica. De forma geral, as colônias apresentaram coloração em vários tons de verde, variando de verde acinzentado a verde escuro (oliva), a maioria das colônias apresentaram boa esporulação, porém algumas, como o isolado M105 e M47 apresentaram crescimento micelial denso e esporulação escassa. Pode ser observada também, a grande diversidade morfológica e fenotípica que

existe entre as colônias da mesma espécie, como acontece com os isolados da espécie *M. anisopliae* e *M. robertsii*.

As diferenças nas sequências foram comparadas num alinhamento de 809 posições (Tabela 8) em que as diferenças intraspecíficas de *M. anisopliae* foram detectadas em até seis posições, enquanto a variação intraespecífica *M. robertsii* foi observado em até vinte e sete posições. Diferenças de pares de bases entre os isolados de *M. anisopliae* e *M. robertsii* variou de 2 a 20 posições, os isolados de *M. anisopliae* e *M. brunneum* variou de 18 a 21 posições, enquanto que o isolado de *M. flavoviride* diferiu de 103 a 113 posições dos isolados de *M. anisopliae*, *M. robertsii* e *M. brunneum*, demonstrando tanto as diferenças intraespecíficas como interespecíficas entre as espécies, sendo possível então detectar polimorfismo de nucleotídeo único - SNPs a partir dessas sequências obtidas como exemplificado na Figura 41 e desenhar primers específicos para cada espécie de uma maneira mais abrangente e mais especificamente de isolados.

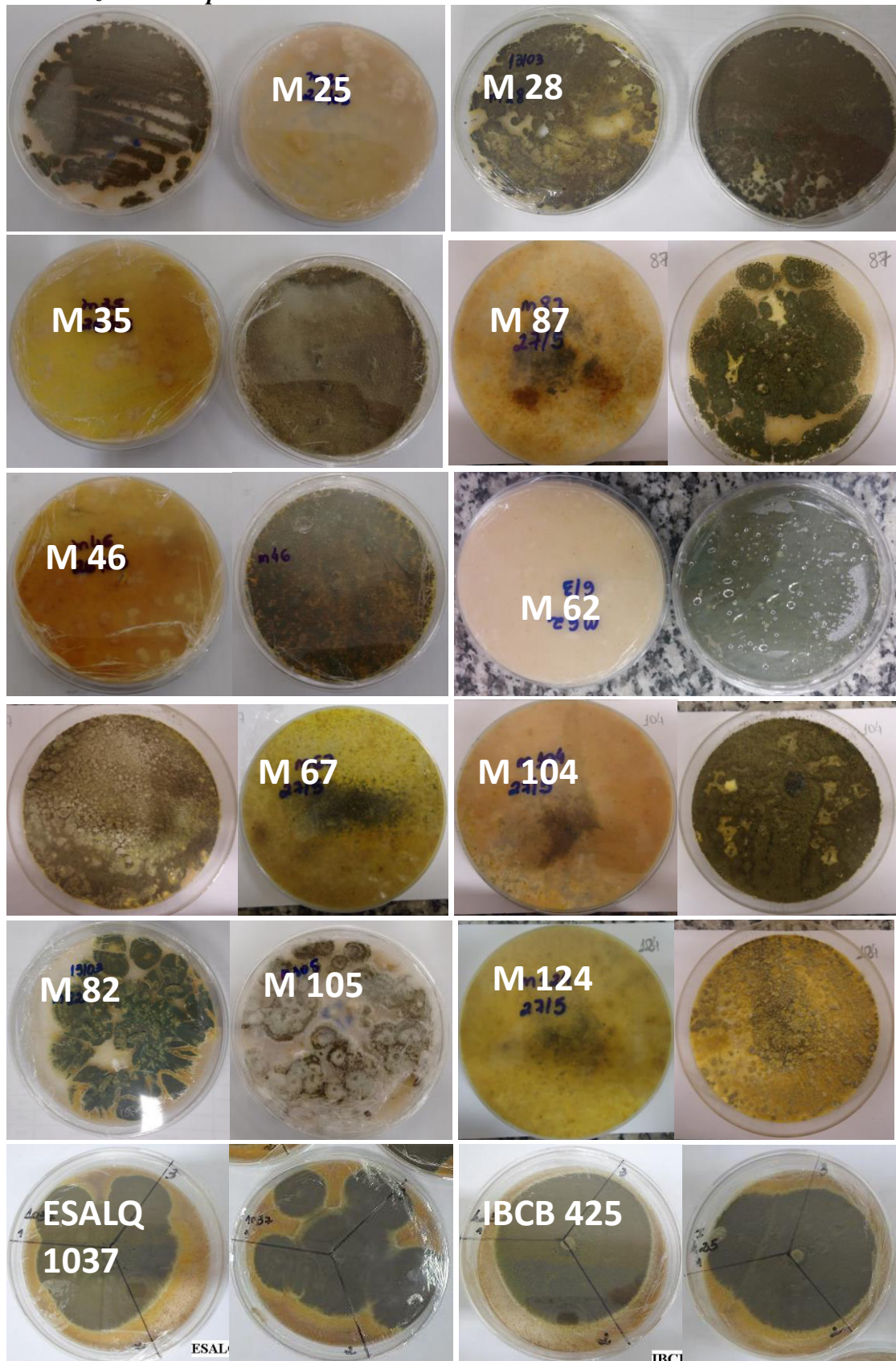
Os seguimentos gerados na sequência parcial da região 5' EF1- α mostram que este locus é realmente mais variável do que o locus do ITS, conforme indicado por Renher, (2005), que realizou uma análise filogenética do gênero *Beauveria* e várias espécies de *Cordyceps* baseadas em reconstruções de EF1- α e ITS e a região EF1- α foi muito mais informativa para inferência de relacionamentos em *Beauveria* do que ITS que teve suporte muito baixo na filogenia, mesmo quando combinou ITS e EF1- α para verificar a filogenia foi observado conflitos topológicos. Portanto, a região 5' EF1- α , é potencialmente mais útil para resolução da filogenia e para o diagnóstico de diversidade molecular do complexo de espécies de *M. anisopliae*. Isso pode ser demonstrado na Figura 37 e Figura 39, através dos isolados que estão marcados com um símbolo (estrela) tanto na árvore filogenética de ITS quanto de 5' EF1- α , pois em ITS todos os isolados marcados estão agrupados em um mesmo grupo, no grupo I que não está bem resolvido pois agrupou espécies muito próximas em um único grupo, já no 5' EF1- α os mesmos isolados foram resolvidos e agrupados em grupos distintos, ou seja, em espécies diferentes, *M. robertsii* e *M. brunneum* com boa resolução, sendo possível então sua identificação taxonômica, sendo o mesmo observado por Renher (2005). Kleper e Renher (2013), em seus estudos com o gênero *Metarhizium* reforçam essa teoria, pois, mesmo apontando uma sequência parcial da região MzIGS3 como mais variável e indicada para o diagnóstico de diversidade molecular em *Metarhizium* do que a região 5' EF1- α , cita que, por outro lado, a filogenia dessa espécie não é satisfatoriamente resolvida com a região MzIGS3, pois, ao mesmo tempo que reforça alguns pontos, difere em outros da filogenia 5' EF1- α .

Figura 39. Árvore filogenética das sequências do gene 5' EF1- α dos 22 isolados de *Metarhizium* pré-selecionados estudados no presente trabalho com as sequências de referência do GeneBank com o número de acesso indicado. O método utilizado para a construção da árvore foi Neighbor-Joining sendo as distâncias evolutivas calculadas utilizando o método de Tamura-Nei. A confiança foi confirmada com 1000 repetições de bootstrap.



Figura 40. Diversidade morfológica e fenotípica das colônias dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp.

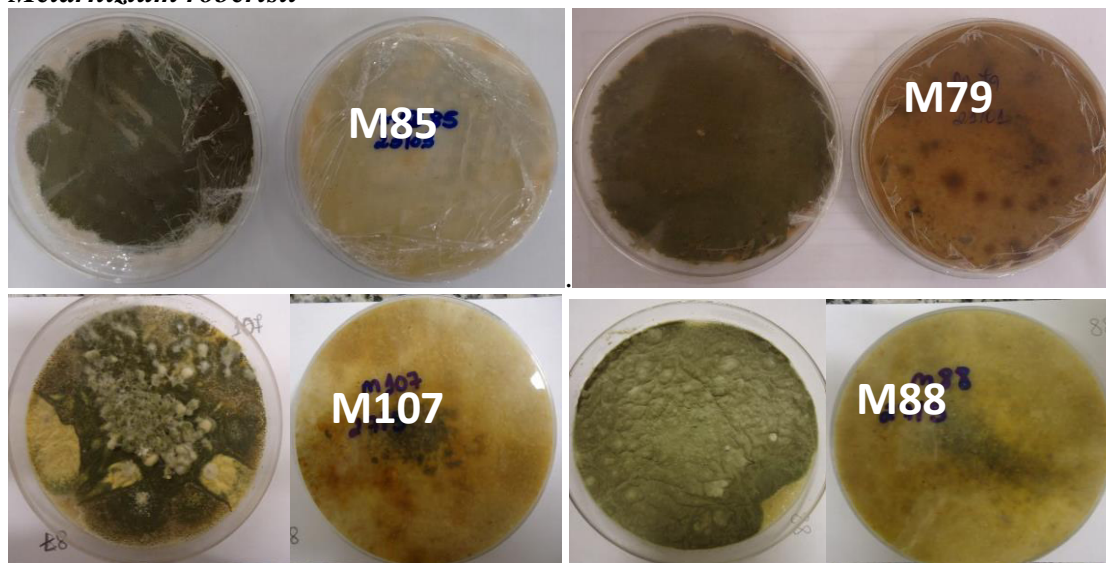
Metarhizium anisopliae



Continua

Continuação. Diversidade morfológica e fenotípica das colônias dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp.

Metarhizium robertsii



Metarhizium brunneum

Metarhizium flavoviride



Tabela 8. Diferenças entre os pares de bases das sequências 5' EF1- α dos 22 isolados de *Metarhizium* spp., sendo *M. anisopliae* (Ma), *M. robertsii* (Mr), *M. brunneum* (Mb) e *M. flavoviride* (Mf). Números indicando que houve diferenças entre pares de bases quando comparados entre si e entre espécies. Possui um total de 809 posições no conjunto de dados alinhados resultantes.

Espécies	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	Mb	Mf
Isolados	25	28	35	48	62	67	82	83	87	104	124	IBC859	IBC8425	ESALQ1037	105	46	79	85	88	107	95	47	
Ma	25	0																					
Ma	28	3(2)	0																				
Ma	35	3(2)	0	0																			
Ma	48	3(2)	0	0	0																		
Ma	62	3(2)	0	0	0	0																	
Ma	67	3(2)	0	0	0	1(0)	0																
Ma	82	7(4)	4(2)	4(2)	4(2)	6(4)	5(3)	0															
Ma	83	7(4)	4(2)	4(2)	4(2)	6(3)	4(2)	2(2)	0														
Ma	87	3(2)	0	0	0	1(0)	0	5(3)	5(3)	0													
Ma	104	3(2)	0	0	0	1(0)	0	5(3)	5(3)	0	0												
Ma	124	3(2)	0	0	0	1(0)	6(4)	6(3)	1(0)	1(0)	0												
Ma	IBC859	3(2)	0	0	0	2(1)	1(1)	5(2)	6(4)	1(1)	1(1)	2(1)	0										
Ma	IBC8425	3(2)	0	0	0	1(1)	1(0)	5(3)	6(3)	1(0)	1(0)	1(1)	2(1)	0									
Ma	ESALQ1037	3(2)	0	0	0	2(1)	1(1)	6(4)	6(4)	1(1)	1(1)	2(1)	2(2)	2(1)	0								
Ma	105	3(2)	0	0	0	1(0)	0	5(3)	4(2)	0	0	1(0)	1(1)	1(0)	1(1)	0							
Ma	46	7(4)	4(2)	4(2)	4(2)	5(2)	4(2)	1(1)	1(1)	4(2)	4(2)	5(2)	5(3)	5(2)	5(3)	4(2)	0						
Mr	79	18(4)	15(2)	15(2)	15(2)	17(2)	16(2)	18(5)	17(4)	16(2)	16(2)	17(2)	17(3)	17(2)	17(3)	16(2)	17(4)	0					
Mr	85	18(3)	15(3)	15(3)	15(3)	18(4)	16(3)	20(7)	19(7)	17(4)	16(3)	18(4)	7(4)	7(3)	18(5)	16(3)	17(5)	1(1)	0				
Mr	88	2(1)	0	0	0	4(3)	4(3)	9(5)	9(6)	4(3)	4(3)	4(3)	4(2)	4(3)	5(4)	4(3)	7(4)	19(4)	27(11)	0			
Mr	107	18(4)	16(3)	16(3)	16(3)	18(3)	17(3)	19(6)	19(6)	17(3)	17(3)	18(3)	18(4)	18(3)	18(4)	17(3)	18(5)	1(1)	2(2)	16(6)	0		
Mb	95	20(3)	18(1)	18(1)	18(1)	20(1)	19(1)	21(4)	21(4)	19(1)	0	20(1)	20(2)	20(1)	20(2)	19(1)	20(3)	21(3)	22(4)	22(3)	22(4)	0	
Mf	47	110(34)	108(33)	108(33)	109(34)	109(34)	109(34)	109(36)	110(37)	109(34)	109(34)	109(34)	109(34)	109(34)	109(34)	109(34)	109(36)	103(32)	103(32)	109(34)	104(33)	113(37)	0

Tabela 9. Tabela demonstrando os 22 isolados de *Metarhizium* identificados pelo sequenciamento do gene 5'EF1- α .

ISOLADO	ORIGEM	ANO	HOSPEDEIRO	LOCALIDADE	IDENTIFICAÇÃO ESPECIE/Região EF1
MBIO 25	CG 630 - <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	2009	<i>Rhammatocerus schistocercoides</i>	Silvânia - GO	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 28	CG 30 - ESALQ - <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>ar</i>	2009	<i>Deois flavopicta</i>	Espírito Santo	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 35	CG 340 - <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisoplia</i>	2009	<i>Mahanarva posticata</i>	Pernambuco	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 48	Ma 283 - <i>Metarhizium anisopliae</i> 23/12/2004	2009	Solo	Sapezal - MT	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 62	Solo 20 - Usina Rio Vermelho	2009	Solo - cana	Junqueirópolis - SP	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 67	Solo 22 - Tupi Paulista - SP - Faz. 3 Meninas	2009	Solo - cana	Tupi Paulista - SP	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 79	Solo 65 ³ - Fazenda Boa Esperança 2	2009	Solo - cana	Cachoeira Alta - GO	<i>Metarhizium robertsii</i>
MBIO 82	Solo 63 ² - Fazenda São José	2009	Cana	Cachoeira Alta - GO	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 83	Solo 13- Águas de Santa Barbara	2009	Pasto	Água Santa Barbara - SP	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 85	Solo 65 ¹ - Fazenda Boa Esperança 2	2009	Cana	Cachoeira Alta - GO	<i>Metarhizium robertsii</i>
MBIO 87	Solo Usina Rio Vermelho 3	2009	Solo - cana	Junqueirópolis - SP	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 88	Solo Rinópolis 3	2009	Cana	Rinópolis - SP	<i>Metarhizium robertsii</i>
MBIO 95	Solo 65 ⁴ - Fazenda Boa Esperança 2	2009	Cana	Cachoeira Alta - GO	<i>Metarhizium brunneum</i>
MBIO 104	Inseto Parasitado (Selvagem)	2011	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Fazenda Cassita - Lucélia - SP	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 107	Inseto Parasitado (Coleta 30 dias)	2011	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Fazenda Cassita - Lucélia - SP	<i>Metarhizium robertsii</i>
MBIO 124	Solo 1 - Fazenda Santa Luzia 3	2012	Solo - cana	Fazenda Santa Luzia 3 - Lucélia - SP	<i>Metarhizium anisopliae</i>
IBCB 59	IBCB 59 - Instituto Biológico	2009	Desconhecido	Desconhecido	<i>Metarhizium anisopliae</i>
IBCB 425	IBCB 425 - Instituto Biológico	2009	Solo Mata Atlântica	Iporanga - SP	<i>Metarhizium anisopliae</i>
E1037	ESALQ 1037 (2ª placa)	2010	Adulto <i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 105	Inseto Parasitado (Actara)	2011	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Fazenda Cassita - Lucélia - SP	<i>Metarhizium anisopliae</i>
	CG 439- <i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> - USDA- ARS (ARSEF 2024; CBS 700.74)	2009	<i>Otiorynchus sulcatus</i>	USDA- ARS- França	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MBIO 46	CG 645- <i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> - CSIRO	2009	<i>Pemphigus treherni</i>	Reino Unido	<i>Metarhizium flavoviride</i>

Figura 41. Comparação entre as sequências 5'EF1- α obtidas dos isolados de *Metarhizium* para demonstrar como exemplo de regiões variáveis entre as espécies que estão destacadas pela cor cinza. Alinhamento realizado e extraído do programa GeneDoc.



3.1.3 Análises das Sequências de ITS e 5' EF1- α com dados dos marcadores Microsatélites - SSR

Além das análises de ITS e 5'EF1- α também foi realizada uma análise de agrupamento obtida a partir das medidas de similaridade baseadas no índice de Jaccard e pelo método aglomerativo UPGMA. O dendrograma construído com os dados SSR (Figura 42) permite visualizar a similaridade genética e separação dos isolados de *Metarhizium* sp. bem como a existência ou não de correspondência entre a análise ITS e 5'EF1- α . O resultado demonstra uma alta variabilidade entre os isolados de *Metarhizium*. De acordo com a Figura 42, foram identificados 57 haplotipos a partir dos oito locos utilizados, dentre um total de 118 isolados, considerando os isolados estudados anteriormente por Bovi (2012) e os isolados estudados neste trabalho, sendo que somente os 22 isolados do presente estudo apresentaram 17 haplótipos. A similaridade entre os haplótipos obtidos variou entre 8 e 100%.

De uma maneira geral podemos observar que a maioria dos 118 isolados se agruparam em dois grupos, pertencendo a apenas dois haplótipos, sem nenhuma diversidade entre eles praticamente, e que somente após a seleção destes isolados os mesmos apresentaram grande diversidade entre eles, ou seja, os 22 isolados selecionados foram provenientes de 17 haplótipos, um número alto de haplótipos para um grupo pequeno de isolados, sendo quase haplótipos exclusivos para cada um dos isolados. Rezende (2015), em seus estudos com isolados brasileiros encontrou apenas 10 haplótipos de um total de 96 isolados, demonstrando a importância da seleção de isolados potenciais para programas de controle biológico. Um único haplotipo dificilmente controlará várias espécies de pragas que ocorre em uma dada cultura, sendo necessário todo o processo de seleção e caracterização para tornar o controle microbiano mais eficiente para cada inseto alvo. Sem esse processo de seleção, a efetividade do controle ficará seriamente comprometida, levando o programa de controle ao fracasso, denegrindo, equivocadamente, a imagem do controle biológico. Essa dominância de um genótipo particular de *Metarhizium* sp. também foi observada em estudos sobre a diversidade genética de campos de grama em British Columbia (INGLIS et al., 2008) e em uma coleção de isolados da região de Matten na Suíça (OULEVEY et al. 2009).

Apesar da correspondência na alta variabilidade e grande quantidade de haplótipos, os dados obtidos com SSR não proporcionou boa resolução, pois como pode ser observado a técnica é eficaz para demonstrar a diversidade genética dentro de uma população e

apresenta alta capacidade para identificação de isolados (haplotipos) de acordo com algumas características e correlacionar com origem geográfica, hospedeiros, ancestrais comuns provenientes de instituições de pesquisa e comerciais, porém não foi capaz de resolver as espécies, como ocorreu com ITS. Pois, de acordo com os resultados obtidos com o SSR no dendrograma UPGMA, o sequenciamento do 5'EF1- α não demonstrou agrupamento semelhante com o dendrograma de Neighbor joining com relação aos grupos de espécie do complexo *Metarhizium*, somente alguns isolados como o M 48, 25, 62 e 87 se agruparam nos dois maiores grupos de isolados (haplótípos) sugerindo que são possivelmente *M. anisopliae*, porém o isolado M47 está localizado no dendrograma entre esses dois grandes grupos. Os isolados de *M. robertsii* ficaram mais distantes de outras espécies e entre eles mesmos, porém não formaram um grupo em si no dendrograma de SSR. O único isolado de *M. brunneum* M95 foi o mais distante de todos os outros com 0,40% de similaridade com o isolado M 79 de *M. robertsii* e 0,15% com os isolados de *M. anisopliae* e *M. flavoviride*.

Os marcadores SSR são polimórficos e são potencialmente independentes de segregação, que são critérios importantes quando discriminam organismos estreitamente relacionados e análise genética populacional (Avis 2004) apresentando alta capacidade para identificação de isolados (haplotipos) e caracterização de coleções de isolados de *Metarhizium* sp. Porém quando comparados com técnicas mais avançadas como sequenciamento de alguns genes, existem algumas preocupações tais como: 1) a percepção do tamanho do alelo pode variar dependendo do método de amplificação (qual corante é usado e se os oligos de amplificação são marcados diretamente ou são adicionados via PCR em iniciadores M13 marcados como descrito por Schuelke (2000); 2) Subjetividade na análise dos alelos, pois os picos são analisados visualmente; 3) há uma diversidade críptica significativa dentro de espécies atualmente reconhecidas, de modo que as associações de alelos com os conceitos das espécies atuais seriam imprecisas; e 4) observamos allelomorfos de tamanho idêntico em diferentes espécies crípticas que diferem em flanqueamento bem como sequências repetidas (onde esses alelos pode ser sequenciado, o que é um problema técnico irritante), de modo que as informações de mobilidade sozinhas podem ser problemáticas.

Segundo Kepler e Renher (2013), após utilizar marcadores SSR por um longo tempo em seus estudos com *Beauveria* e *Metarhizium* concluíram que o sequenciamento é o melhor método para identificar e agrupar isolados de *Metarhizium anisopliae*. Hoje, além de utilizar a região EF1 para ambos os táxons, utilizam regiões de sequências intergênicas

nucleares altamente variáveis que eles mesmos desenvolveram. Estes métodos de sequenciamento têm ajudado tremendamente a descobrir substancial diversidade filogenética subjacente em ambos os táxons e muitas vezes descobrir que haplótipos de seqüência diferentes destes loci são úteis para o diagnóstico rápido e decisivo de espécies e limites populacionais.

Desta forma, nosso ponto de partida filosófico para a caracterização isolada é através da análise filogenética das seqüências, mesmo o sequenciamento sendo caro, mas todos os dados moleculares, incluindo microssatélites, têm custos significativos. Além disso, os dados da seqüência são facilmente arquivados e conveniente para comparação entre diferentes projetos e entre laboratórios. Um banco de dados ideal seria começar com a identificação espécie / linhagem e, em seguida, associar os dados de microssatélites relevantes, pois são altamente complementares e informativos. Dessa forma, alelos homoplásicos, alelos privados, etc. seriam claramente visíveis para qualquer pessoa que trabalhasse a partir desses dados. Além do mais, essas mesmas seqüências poderiam ser utilizadas para detecção de SNPs e desenho de primers específicos para cada isolado.

Figura 42. Dendrograma baseado na similaridade de Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA pela análise dos alelos gerados por oito locos SSR de isolados de *Metarhizium* ssp.. A consistência dos nós foi obtida através de 10.000 reamostragens “bootstrap”



3.1.4 Discussão Geral

3.1.4.1 Identificação, rastreabilidade e controle de identidade genética

Tradicionalmente, a identificação de *Metarhizium* spp. É baseado nas características morfológicas das colônias em meios artificiais e no exame microscópico de esporos, conidióforos e outras estruturas (Bridge et al., 1997). Erros de identificação e dificuldades de identificação são freqüentemente encontradas porque diferentes morfologias podem ser exibidas em diferentes condições ambientais e fisiológicas (Entz et al., 2005). No presente estudo, dois isolados antigos da coleção de fungos do CENARGEM o M46 e M47 foram utilizados como padrões de *M. flavoviride* e apenas um deles foi classificado como tal, o outro se agrupou com os isolados de *M. anisopliae*, sendo classificado erroneamente, com técnicas mais antigas de classificação. Vários trabalhos indicaram que a morfologia conidial era incongruente e que com sequência de 5 'EF-1^a, conforme mencionado por Bischoff et al. (2009), estudo filogenético mais detalhado do clado MGT é necessário para avaliações mais precisas de identificação dessa espécie. Com isso, tornou-se evidente a necessidade de uma nova abordagem para a identificação de táxons de maneira mais eficiente, ou seja, o uso de técnicas mais modernas e precisas.

Os espaçadores internos transcritos (ITS) da região do DNA ribossomal têm maior probabilidade de identificação bem sucedida para a mais ampla variedade de fungos, inclusive quanto a diversidade marinha e foi utilizado como uma região de referência na identificação de fungos por um longo tempo (ANDREAKIS et al., 2015). Segundo Schoch et al. (2011), regiões 5.8 S (ITS) e 18S (subunidade menor do ribossomo-SSU) do RNAr apresentam alta performance como códigos de barras de DNA padrão para fungos.

Contudo, com o avanço de técnicas mais modernas e a dificuldade na resolução de espécies próximas encontradas com o ITS, inclusive como os dados obtidos neste trabalho que ITS não obteve bons resultados para diferenciação de espécies próximas do gênero *Metarhizium*, genes codificadores de proteínas têm sido utilizados e descritos como códigos de barras mais eficientes na discriminação entre algumas espécies de fungos, como o gene translation elongation factor 1- α (tef-1 α). Bischoff et al. (2006), utilizaram *M. anisopliae* como outgroup para clarificar as relações entre *M. flavoviride* var. *flavovirida*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. flavoviride* var. *pemphigi* e *M. frigidum*. No entanto, a região ITS não forneceram uma resolução suficiente para esclarecer as relações dentro do que Driver et al. (2000) propôs em Clade 6, que continha *M. frigidum* e *M. flavoviride* var.

flavovirida. Enquanto esse conjunto de dados foi incapaz de mostrar a associação precisa de *M. frigidum* a outros membros deste complexo em particular, identificou como uma linhagem distinta e colocou *M. flavoviride* var. *pemphigi* e *M. flavoviride* var. *minus* como taxons irmãos. Com base nesses resultados, concluíram que os dados da sequência ITS são úteis para resolver nós da filogenia de *Metarhizium*, mas não é suficiente para diagnosticar algumas espécies ou muitas infragenericas em *Metarhizium*. Com a disponibilização de ferramentas moleculares auxiliando as análises filogenéticas e a identificação de espécies empregando a região 5'EF1-a como marcador diagnóstico de espécies conforme proposto por Bischoff et al. (2009) foi possível comparar diretamente os resultados de caracterização populacional de *Metarhizium* entre vários estudos recentes.

Bischoff, 2009 reclassificando as espécies do gênero *Metarhizium*, selecionou a região 5'EF1- α para análise posterior, pois dentre os quatro loci analisados, os introns dentro de 5'EF1- α forneceram a maior concentração da variação informativa dos nucleótidos e grau de resolução filogenético para as clades terminais em *Metarhizium*. Nesta análise, a topologia da árvore de 5'EF1- α foi consistente com a Filogenia multigene e concluiu que 5'EF1- α sozinho fornece forte apoio para todas as espécies e, portanto, é o locus mais preciso e conveniente para uso na identificação da espécie, sendo as ferramentas e análises moleculares a maneira mais confiável de diferenciar espécies dentro do Complexo de *Metarhizium anisopliae*.

Com base nos resultados obtidos neste presente estudo e de Bischoff et al. (2006) e (2009), a região 5' da 5'EF1- α é até a presente data a mais informativa a ser usada para identificação de espécies de rotina dentro do gênero. Esta região requer apenas dois primers e é facilmente amplificada. Embora 5'EF1- α sozinha não é suficiente para resolver completamente a genealogia de *Metarhizium*, é atualmente o único locus e o mais útil para o diagnóstico de grupos terminais como fez Geiser et al. (2004) para identificar espécies de *Fusarium*.

Estudos futuros devem ser direcionados no uso da região EF1 para o reconhecimento e identificação de espécies filogenéticas e, através de suas sequências geradas, as quais fornecem a maior concentração da variação informativa dos nucleótidos, identificar polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples – SNPs. SNP é uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma base (adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G) na sequência do genoma para o desenvolvimento de primer e sondas específicas para detecção, identidade e pureza genética de um isolado de interesse ou vários ao mesmo tempo utilizando microarranjos ou macroarranjos com técnicas de

ponta, promovendo a agricultura sustentável em seus aspectos econômicos, ambientais e sociais. Atualmente, uma tecnologia de baixo volume de ensaios de qPCR em microarranjos processa automaticamente e de forma simultânea nanolitros de múltiplas amostras, como por exemplo o sistema BioMark ou Juno da Fluidigm. Essa solução é inovadora porque faz várias reações em tempo real com microfluidos, reduzindo custos, etapas e tempo de execução (ISHII, 2013, 2014; FLUIDIGM, 2016). Esforços para o desenvolvimento de métodos moleculares de detecção múltipla, simultânea, robusta e quantitativa desses organismos podendo ser interessantes tanto para as biofábricas quanto para o governo no registro e fiscalização de produtos a base desse fungo e de outros utilizados como bioinseticidas (LIEVENS, 2005).

Desta forma, a tecnologia pode se empregada com grande potencial de retorno em aplicações baseadas em plataforma WEB que permitem uma maior interação entre as pessoas em tempo real. A certificação da qualidade dos produtos registrados deve ser assegurada. Essa técnica poderá ser utilizada como uma excelente ferramenta para o estabelecimento de programas de controle de identidade genética nas biofábricas que podem utilizar a técnica para controlar a qualidade de sua produção comercial, evitando contaminações e/ou mutações, monitorar os micoinseticidas de maneira correta e distinguível de outros existentes no campo que possam co-existir nos locais de aplicação, para evitar a clonagem de seus isolados superiores e ainda garantir autenticidade e qualidade do isolado registrado por determinada empresa, pois as variações fenotípicas freqüentemente estão correlacionadas com as variações genotípicas, exceto em casos quando o fenótipo é determinado por condições ambientais. Variações genotípicas podem ser acessadas usando os marcadores genéticos, que por sua vez, podem ser utilizados como etiquetas para o diagnóstico dos isolados selecionados.

A utilização dessa técnica pode assumir uma dimensão ainda maior a nível nacional e governamental para o registro de isolados de fungos entomopatogênicos e de produtos técnicos ou produtos formulados. Institutos de Pesquisa, Universidades e Entidades Governamentais também poderão utilizar a Plataforma não só para registros de isolados (CGEN) e micoinseticidas (MAPA), mas também para assegurar a identidade genética e a estabilidade do isolado e avaliar sua utilização em condições de campo e seu possível impacto ao meio ambiente (ABCBIO). A base de dados também é de extrema importância para o monitoramento da diversidade genética e para o melhoramento genético e seleção de isolados de fungos entomopatogênicos mais eficientes. Há também uma preocupação do

MAPA, IBAMA e ANVISA em determinar padrões de controle de qualidade para regularização das empresas produtoras de micoinseticidas a base de fungos (BOVI, 2012).

3.1.4.2 Associação de *Metarhizium* com habitats, hospedeiros e virulência

De acordo com a região 5'EF1- α dos 22 isolados selecionados de *Metarhizium* do presente estudo, foi observado a ocorrência de quatro linhagens específicas: *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. brunneum* e *M. flavoviride*. A maioria desses isolados (n = 16) é membro da linhagem *M. anisopliae*, sendo a maioria provenientes de solo de cana-de-açúcar (n = 9) e alguns provenientes de insetos hospedeiros variados (n = 7), indicando que essa espécie é muito comum no Brasil, e com vasta amplitude ecológica. Os isolados mais agressivos para *Diatraea saccharalis* com 100% de parasitismo e com menores TL₉₀ obtidos neste trabalho pertencem a esta espécie. Outros autores de trabalhos com isolados brasileiros e estudando a mesma região 5'EF1- α , também encontraram a predominância dessa espécie no Brasil, como Rezende (2015) com 73% dos isolados estudados pertencentes a *M. anisopliae* e Rocha et al. (2012) que, estudando a diversidade de *Metarhizium* em solos do Cerrado brasileiro no Estado de Goiás, observaram que *M. anisopliae* (n = 53) e *M. robertssi* (n = 8) foram as principais linhagens recuperadas, sendo a espécie *M. anisopliae* a predominante. Desta forma, *M. anisopliae* com sua aparente predominância no Brasil e América Latina parece ser um dos principais candidatos para investigações mais detalhadas a fim de elucidar seu papel na regulação de populações de insetos de forma natural ou em programas de controle biológico.

Por outro lado, a segunda espécie mais encontrada foi a do *M. robertssi*, com quatro isolados, sendo quase todos provenientes de solo, com exceção de um único isolado que veio de inseto parasitado. Apesar de *M. robertssi* aparentemente manter uma tendência saprofítica por serem mais comuns em solos e uma relação trófica com a rizosfera, já que também podem melhorar a aptidão da planta, esta espécie também pode apresentar elevada agressividade, pois todos os isolados desta espécie nos testes de agressividade deste estudo apresentaram valores acima de 90% de parasitismo para lagartas de *Diatraea saccharalis*, demonstrando potencial para o uso em programas de controle biológico para controle dessa praga, com possível diferencial competitivo de persistência no solo. Esta espécie também foi encontrada parasitando *Phyllophaga capillata* (LOPES et al., 2013b), *G. mellonella* e larvas *T. molitor* (STEINWENDER et al., 2011), usados como iscas para captura de fungos entomopatogênicos do solo, confirmando assim a sua competência ecológica e seu

potencial patogênico a insetos. Outro dado significativo é que foram selecionados também, dentre todos os outros isolados de *Metarhizium* deste trabalho, um isolado dessa espécie o M107 e um de *M. anisopliae* o M48 como não patogênicos para o parasitoide *Cotesia flavipes*, ou seja, demonstrando que podem ser utilizados em programas de Manejo Integrado juntamente com esse parasitoide, até mesmo em composição que não causará a morte desse inseto tão benéfico e tão utilizado no controle biológico no Brasil. Além disso, já foi observado que *M. robertsi* é capaz de capturar nitrogênio de cadáveres de insetos por eles parasitados e transmitir às plantas por meio da associação com a rizosfera (BEHIE et al., 2012), o que demonstra o seu potencial para modular ambas as capacidades simbióticas simultaneamente e o seu potencial como um organismo interessante e complexo que deve ser mais investigado e explorado para o desenvolvimento de produtos biológicos com características inseticidas de controle de insetos e características bioestimulantes que tragam benefícios às plantas.

Com relação a localização geográfica, foram encontradas 3 espécies diferentes, *M. anisopliae*, *M. robertsi* e *M. brunneum* em duas fazendas próximas da Usina Central Energética do Estado de Goiás e no interior do Estado de São Paulo, na cidade de Lucélia em uma mesma fazenda foram encontradas 2 espécies diferentes, *M. anisopliae* e *M. brunneum*. Através da técnica de microssatélites utilizada na dissertação de mestrado de Bovi, 2012, foi possível a identificação da existência de ampla diversidade genética em escala regional e mesmo dentro de uma fazenda, pois esse mesmo grupo de isolados e alguns mais da Fazenda Boa Esperança, no Estado de Goiás, apesar de estarem todos reunidos em um único grupo pelo STRUCTURE, nenhum deles pertencia ao mesmo haplotipo. Estes resultados estão em acordo com os encontrados por Oulevey et al. (2009) estudando isolados de três coleções na Suíça e aos de Bidochka et al. (2001) analisando campos de floresta e agricultura em Ontário no Canadá. O mesmo também foi observado por Rezende (2015), quando encontrou também a ocorrência de 3 espécies e 9 haplótipos de *Metarhizium* em amostras de solo e rizosfera de uma área de canavial de apenas 6000 m² do Estado de São Paulo, bem diferente da diversidade encontrada a nível nacional, que dos 96 isolados obtidos foram identificadas apenas quatro espécies e 17 haplótipos, demonstrando que existe uma diversidade regional interespecífica alta. Por outro lado, no México, Bautista-Galvez et al. (2012) amostrou 33 áreas de cana-de-açúcar, possuindo cada campo amostrado em média 6 ha e 31 dessas áreas eram áreas que não recebiam aplicação do fungo e só conseguiram isolar 10 colônias da espécie *M. anisopliae* e com

RAPD conseguiram identificar dois genótipos, demonstrando uma diversidade muito inferior a encontrada nos estudos do Brasil, reforçando a rica biodiversidade do país.

Desta maneira, este estudo demonstrou grande variabilidade genética em escala regional intraespecífica das espécies de *Metarhizium* apresentadas por EF1- α , sugerindo que se faz necessária uma amostragem mais detalhada e complexa em escalas regionais para avaliar rigorosamente a estrutura da comunidade de *Metarhizium* spp. nos locais de interesse para implantação de programas de controle biológico de pragas. Investigações da ocorrência de *Metarhizium* spp. também em maiores áreas com habitats mais diversos e abrangentes poderão em um futuro próximo elucidar a composição de espécies e a variação na estrutura e ecologia das populações em cada região. Além disso, a melhoria no conhecimento da ecologia deste fungo como um entomopatógeno beneficiará a seleção, o manejo e o monitoramento desses agentes de controle biológico de insetos.

CONCLUSÃO GERAL

- As metodologias utilizadas foram eficazes para demonstrar que todos os isolados pré-selecionados avaliados neste estudo possuem elevada virulência contra lagartas de *D. saccharalis*, sendo possível comprovar a eficiência desses isolados no controle dessa praga;
- Os resultados do presente estudo demonstraram que mesmo sendo isolados que já haviam passado por uma seleção anteriormente ainda apresentam variabilidade quanto à patogenicidade dos isolados com diferenças na distribuição da mortalidade ao longo do tempo;
- A estimativa do tempo letal para matar 90% de uma população de insetos (TL₉₀), variou de 5,39 dias para M 13 a 7,49 dias para M 20, sendo M13 o isolado mais rápido no controle de lagartas de *D. saccharalis*.
- Os resultados dos testes de compatibilidade demonstraram que a maioria dos isolados do fungo *Metarhizium* spp. apresentaram algum grau de patogenicidade à *C. flavipes*, destacando a importância dos experimentos de seleção para obtenção de isolados menos patogênicos;
- Foi possível a seleção de apenas dois isolados menos patogênicos ao parasitoide *C. flavipes*, o M 01 (*M. robertssi*) e o M 19 (*M. anisopliae*), com resultados semelhantes ao da testemunha;
- Os isolados estudados com ITS se agruparam junto as espécies de *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. piganhaense*, *M. brunneum* e *M. guizhouense* e identificados 8 haplótipos, ou seja, ITS não teve uma boa resolução para definir as espécies, pois não conseguiu separar as espécies muito próximas, não podendo então, ser definida e identificada a espécie de cada isolado;

- ITS, neste trabalho, se mostrou incapaz de reconstruir a filogenia, dificultando a sua utilização como sequência diagnóstica na identificação ou análise filogenética de espécies mais próximas de *Metarhizium*.
- A análise filogenética de EF1 revelou agrupamentos que identificaram os isolados analisados em quatro espécies, *M. anisopliae*, *M. robertssi*, *M. brunneum* e *M. flavoviride*, determinando a identidade taxonômica de todos os isolados utilizados neste trabalho;
- *M. anisopliae* foi a espécie mais frequente entre os isolados selecionados com 73% de todos eles, seguido por 18% de *M. robertssi*.
- A região 5' EF1- α revelou uma diversidade total de 13 haplótipos dentre os 22 isolados, sendo nove haplótipos pertencentes a *M. anisopliae* e dois a *M. robertssi*, sendo correspondentes aos dados obtidos com microssatélites -SSR para os mesmos 22 isolados com 17 haplótipos, evidenciando a existência de uma diversidade bem alta entre os isolados, pois, os isolados selecionados do presente estudo já vieram de uma seleção de indivíduos com padrões SSR diferentes, gerando assim uma alta diversidade intra-específica entre eles;
- O uso do polimorfismo da região 5' EF1- α poderá ser utilizada para o desenvolvimento de primers e sondas específicas para detecção, identificação e pureza genética, certificação, rastreabilidade e controle de qualidade de isolados de *Metarhizium* spp

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, J.P.M.; SAMUELS, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, n. 2, p. 187-192, 2007.
- AGRIANUAL: *Anuário da agricultura brasileira*. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2009. p. 235-259.
- AGÜERO, M. A.F., NEVES, P. M. O. J. **Selectivity of *Metarhizium anisopliae* to *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae)**. *Investig. Agrar.* 2014; 16(1): 21-28.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. 1979. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA, A. **Banco de microrganismos entomopatogênicos**. *Biotec.Ciênc. Desenv.*, n. 20, p. 31-33, 2001.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. **Banco de microrganismos entomopatogênicos**. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, São Paulo, n.20, p.30-33, 2001.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. **Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae***. *Boletim Técnico do Instituto Biológico*, São Paulo, 19pp., 2006.
- ALMEIDA, J.E.M.; ROCHA, T.C.; BATISTA FILHO, A. **Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticidas**. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.74, n.4, p.369-371, 2007.
- ALMEIDA, L.C. DE; ALVES, S.B.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; PINHEIRO, J.B. **Determinação da patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., sobre ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) de diferentes idades**. *Revista Brasil Açucareiro*, v.102, n.2, p.20-27, 1984.
- ALVES, S. B. **Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.*, v. 27, p. 77-86, 1992.
- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ALVES, S.B. **Fungos Entomopatogênicos**. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 289-382, 1998b.
- ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414p.

ANDREAKIS, N.; HØJ, L.; KEARNS, P.; HALL, M.R.; ERICSON, G.; COBB, R.E.; GORDON, B.R.; EVANS-ILLIDGE, E. Diversity of Marine-Derived Fungal Cultures Exposed by DNA Barcodes: The Algorithm Matters. **PLoS One.**; 10(8):e0136130, 26 of Aug 2015.

ARRUDA, W. **Caracterização moleclar e morfofisiologica de diferentes isolados do fungo entomopatogenico metarhizium anisopliae e análise morfológica do processo de infecção em Boophilus microplus.** Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

AZEVEDO, V. C. R. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae.** 1992. 215f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

BAILEY, K. L., BOYETCHKO, S. M. & LANGLE, T. Social and economic drivers shaping the future of biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. **Biol. Control**, v. 52, p.221–229, 2010.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273–2282, 2009.

BALSAMO-CRIVELLI, G. Ossevazione sopra una nuova specie di Mucedinea del genere *Botrytis*. **Biblioteca Italiana Ossia Giornale di Litteratura Scienze ed Arti**, v.39, p.125, 1835.

BARRON, G. 2001. George Barron`s Website on Fungi. Universidad de Guelph, Ontario, Canada. Consultado 15 jul 2011. Disponible en: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>>

BASSI, A. 1835. **Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, malattia che affligge I bachi da seta.** Lodi: Tipografia Orcesi [English translation by PJ Yarrow: 1958. On the On the mark disease, calcinaccio or muscardine, a disease that affects silk worms. Ainsworth GC, Yarrow PJ, eds. APS Phytopathol. Classics 10. p 1–49].

BATISTA FILHO, A.; FIGUEIREDO, M.B.; CRUZ, B.P.B. Fungos entomopatogênicos. In: CRUZ, B.P.B. (Coord.). **Pragas das culturas e controle biológico.** Campinas:Fundação Cargill, 1988. p.36-52.

BAUTISTA-GALVEZ, A., J. F. BARRERA, E. PAYRO DE LA CRUZ, S. SALGADO-GARCIA, J. GOMEZ-RUIZ, AND J. F. GOMEZ-LEYVA.. Genetic characterisation of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin isolates from sugarcane fields and their pathogenicity against *Aeneolamia postica* (Walker) (Hemiptera: Cercopidae). **Universidad y Ciencia, Tropic H umedo** v.28, p.217–229, 2012.

BEAUVERIE, J. Les Muscardines. Le genre *Beauveria*. **Revue Générale de Botanique** , v.26, p.81-157, 1914.

BENHAM, R. W. & MIRANDA, J. L. The genus *Beauveria*, morfological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from wharf-piling bores. **Mycologia**, v. 45, p. 727-746, 1953.

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

BERBEE M. L, TAYLOR J. W. From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. . **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 677-683, 1995.

BERRETA, M. F.; LECUONA, R. E.; ZANDOMENI, R. O.; GRAU, O. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. **J Invertebr Pathol**, v. 71, p. 145–150, 1998.

BEYS SILVA, W.; MITIDIERI S.; SCHRANK, A.; HENNING VAINSTEIN, M. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochem**, v. 40, p. 321–326, 2005.

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

BIDOCHKA, M. J.; MENZIES, F. V.; KAMP, A. M. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. **Arch Microbiol**, v. 178, p. 531–537, 2002.

BIDOCHKA, M. J.; ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Mechanism of deuteromycetes fungal infections in grasshoppers and locusts : an overview. **Memors of the Entomology Society of Canada**, v. 171, p. 213-224, 1997.

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

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

BISSETT, J.; WIDDEN, P. A new species of *Beauveria* isolated from Scottish moorland soil. **Canadian Journal of Botany**, v.66, p.361-362, 1988.

BOIÇA JR., A. L.; LARA, F. M.; BELLODI, M. P. **Influência de variedades de cana-de-açúcar, incorporada em dieta artificial, no desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e no seu parasitismo por *Cotesia flavipes* (Cam.)**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 26, n. 3, p. 537-542. 1997.

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

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; MAGRINI, E.A.; HADDAD, M.L.; RESENDE, L.C.L. Parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) *Trichogramma galloi* Zucchi em diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 141-145, 1995.

BOUCIAS, D. G., PENDLAND, J. C., LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1795–1805, 1988.

BOVI, E.C.V. **Caracterização patogênica e molecular de isolados de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp de diferentes regiões do Brasil para o controle de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae).** 166 f., il. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado -Microbiologia industrial, Universidade Estadual Paulista, São Jose do Rio Preto, SP, 2012.

BOVI, E. C. V.; GOMES, E. ; BAJAY, M. M. ; RODRIGUES, F. C. M. ; GIGLIOTI, É. A. . **Identification and tracking of *Metarhizium* spp. with the use of microsatellite markers *ssr*.** In: XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología, 2014, CARTAGENA - COLOMBIA. Revista Hechos Microbiológicos, Universidad de Antioquia, 2014. v. 5.

BRAGA, D. P. V.; ARRIGONI, E. D. B.; SILVA-FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, v. 5, p. 209-222, 2003.

BRIDGE, P. D.; ABRAHAM, J. D.; CORNISH, M. C.; PRIOR, C.; MOORE, D. The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Mycology**, v. 111, p. 85-90, 1990.

BRITTLEBANKISOIDES, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **J. Invertebr. Pathol**, v. 78, p. 178–182, 2001

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; SANTOS, A. J. N.; PEREIRA-BARROS, J. L. Ação de alguns produtos fitossanitários para adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 30, n. 6, p. 1051-1055, 2006.

BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**, v.31, p.793-800, 2001.

BULAT, P.; DUJIC, I.; POTKONJAC, B.; VIDA KOVIC, A. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 71, p. 37–39, 1998.

BULAT, S. A.; LUBECK, M.; ALEKHINA, I. A.; JENSEN, D. F.; KNUDSEN, I. M. B.; LUBECK, P. S. Identification of a universally primed-PCR-derived sequence-

characterized amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 4758–4763, 2000.

BUTT, T. M.; BECKETT E. T. A. "Structural studies on the infection processes of entomogenous fungi". **International Colloquium for Invertebr. Pathol.**, August 28th-Sept. 2nd, 1994., Montpellier, France. Proceedings, p. 311-314, 1994.

BUTT, T. M.; IBRAHIM, L.; CLARK B. V.; BECKETT, S. J. A. The germination behavior of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. **Mycol. Res.** 99: 945-950. CANNING, E. U. 1982. **An evaluation of protozoal characteristics in relation to biological control pests.** *Parasitology*, v. 84, p. 119-49, 1995.

CAMPOS, M. B. S; MACEDO, N. **Cana-de-açúcar ampliando campo de ataque.** *Cultivar: Grandes Culturas, Pelotas*, v. 6, n. 68, p. 23-26, 2004.

CAPINERA, J. L. Sugarcane **Borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Pyralidae).** University of Flórida, IFAS, 2007.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415–2457. 2007.

CARRILLO, L. 2005. **Los hongos de los alimentos y forrajes: Estructuras.** **Universidad Nacional de Salta.** Facultad de Ciencias Agrarias. Disponible en: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>>. Acesso em: 15 ago 2015.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CAVALCANTI, R. S., A. MOINO JR., G. C. SOUZA & ARNOSTI, A. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.3, p.17-22, 2002.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, v.10, p.357-384, 2000.

CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiology**, n. 4, v. 5, p. 197-203, 1996.

COUTINHO, H. L. C. **Diversidade microbiana e agricultura sustentável.** BDT – Base de dados Tropical. Consultado 15 jul 2011.

CRUZ, I. A **Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil.** Disponível em:<www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2007/circular/Circ_90.pdf> Acesso em: 30 ago 2015.

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

D. W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 907–912, 1996c.

DE HOOG, G. S. Notes on fungicolous hyphomycetes and their relatives. **Persoonia**, v.10, p.33-81, 1978.

DE HOOG, G. S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**, n.1, p.1-41, 1972.

DE HOOG, G. S.; RAO, V. Some new Hyphomyetes. **Persoonia**, v.8, p.207-212, 1975.

DE LA ROSA, W.; SEGURA, H.R.; BARRERA, J.F.; WILLIAMS, T. Laboratory evaluation of the impact of entomopathogenic fungi on *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae), a parasitoid of the coffee berry borer. **Environmental Entomology, Lanham**, v.29, n.1, p.126-131, 2001.

DE MURO, M. A.; ELLIOTT, S.; MOORE, D.; PARKER, B. L.; SKINNER, M.; REID, W. & BOUHSSINI, E. L. M. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). **Mycological Research**, v. 109, p. 294-306, 2005.

DE MURO, M. A.; MEHTA, S. & MOORE, D. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. **Fems Microbiology Letters**, v. 229, p. 249-257, 2003.

DE STEFANO, M.; NUDO, R.; VITI, S. 2004. **Evaluation of 2nd order effects on the seismic performance of RC framed structures: A fragility analysis**. 13th World Conference on Earthquake Engineering, August 1-6, 2004, Vancouver, B.C., Canada, Paper n°. 428.

DEAN, R. A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 35, p. 211-234, 1997. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/1/heitor.html>> Acesso em: 20 set. 2015.

DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucl Acids Res** 19:4008, 1991.

DOSSI, F. C. A.; CONTE, H.; ZACARO, A. A. Histochemical characterization of the embryonic stages in *Diatraea saccharalis* (Lepdoptera: Crambidae). **Entomological Society of América**, v. 99, n. 3, p. 1206-1212. 2006.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycol. Review**, v.104, p. 134-150, 2000.

DUPERCHY, E. 2003. **Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata***. Tese de Doutorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 111 p.

EMBRAPA–Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnológicos. **Coleção de fungos entomopatogênicos do CENARGEN**. Brasília: EMBRAPASPI, 1996. 76p.

ENKERLI, J.; WIDMER, F.; GESSLER, C.; KELLER, S. Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. **Mycological Research**, v. 105, p. 1079–1087, 2001.

ENKERLI, J.; WIDMER, F.; KELLER, S. Long-term field persistence of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. **Biological Control**, v. 29, p. 115–123, 2005.

ENTZ, M. H.; BELLOTTI, W. D.; POWELL, J. M.; ANGADI, S. V.; CHEN, W.; OMINSKI, K.H.; BOELT, B. 2005. Evolution of integrated crop–livestock production systems. p. 137–148. In D.A. **McGilloway** (ed.) Grassland: A global resource. Wageningen Academic Publ., Wageningen, the Netherlands.

ERWIN NORTHOFF, Food and Agriculture Organisation of the United Nations press article, ‘**Red Locust disaster in Eastern Africa prevented**’, <<http://www.fao.org/news/story/en/item/21084/icode/>> (archived at <https://www.imperial.ac.uk/ref/webarchive/54f> on 7/11/13) Acesso em 11 de set de 2015.

ESTRADA, M. E.; CAMACHO, M. V.; BENITO, C. The Molecular Diversity of Different Isolates of *Beauveria bassiana* (BALS.) vuill. As Assessed Using Intermicrosatellites (ISSRS). **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 12, p 240 – 252, 2007.

FAGUNDES, C. BOVI, E. C. V., RODERO, D. P., GIGLIOTI, É. A. **Myco-id: a web-based platform for genetic identification of entomopathogenic fungus using single sequence repeats as molecular markers**. In: XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología, 2014, CARTAGENA - COLÔMBIA. Revista Hechos Microbiológicos, 2014. v. 5.

FALLEIROS, A. M. F.; BOMBONATO, M. T. S.; GREGÓRIO, E. A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brasilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 287-294. 2003.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D.W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **J Invertebr Pathol**, v. 98, p. 69–78, 2008.

FERNANDES, A. C.; BENDA, G. T. A. **Distribution patterns of Brix and fibre in the primary stalk of sugar cane**. Sugar Cane, v.5, p. 8-13, 1985.

FLUIDIGM: Real-Time PCR Analysis User Guide. 68000088. Disponível em: <<https://www.fluidigm.com/documents>>. Acesso em: 14 de out. 2016.

FOLEGATTI, M. E. G. **Interação entre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., 1883 e os principais parasitóides da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794).** Dissertação (Mestrado em Entomologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

FOULY, A. H. Effects of prey mites and pollen on the biology and life tables of *Proprioseiopsis aetus* (Chant) (Acari, Phytoseiidae). **J. Applied Entomol.**, v. 121, p. 435-439, 1997.

FOURNIER, A.; ENKERLI, J.; KELLER, S.; WIDMER, F. A PCR-based tool for the cultivation-independent monitoring of Pandora neoaphidis. **Journal of invertebrate pathology**, v. 99, p. 49-56, 2008.

FREED, S.; JIN, F. L.; REN, S. X. Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from different geographical origins. **World J Microbiol Biotechnol**, 2010.

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

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

FUNGARO, M.H.P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.14, p. 12-16, 2000.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCHHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D. **Entomologia Agrícola**. São Paulo: Ceres, 2002. 920p.

GARGAS, A.; DEPRIEST, P. T. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. **Mycologia**, v. 88, p. 745-748, 1996.

GAO, Q.; JIN, K.; YING, S.H.; ZHANG, Y.; XIAO, G.; SHANG, Y.; DUAN, Z.; HU, X.; XIE, X.Q.; ZHOU, G.; PENG, G.; LUO, Z.; HUANG, W.; WANG, B.; FANG, W.; WANG, S.; ZHONG, Y.; MA, L.J.; ST LEGER, R.J.; ZHAO, G.P.; PEI, Y.; FENG, M.G.; XIA, Y.; WANG, C: Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **PLoS Genet.**, 2011.

GASSEN, M.H. **Patogenicidade de fungos entomopatogênicos para o psilídeo da goiabeira *Triozioida* sp. (Hemiptera: Psyllidae) e compatibilidade de agrotóxicos utilizados na cultura da goiaba sobre estes agentes de controle biológico.** 2006. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006.

GEISER, D.M.; MAR JIMÉNEZ-GASCO, M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T.J.; ZHANG, N.; KULDAU, G.A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **Eur J Plant Pathol.**;v.110, p.473–479, 2004.

GIGLIOTI, E.A. Repensando o controle do complexo broca-podridões em cana-de-açúcar no Brasil. **Revista STAB**, vol.27, p.30-31, 2008.

GIOMETTI, F.H.C.; WENZEL, I.M.; ALMEIDA, J.E.M. Patogenicidade dos isolados IBCB 100 e IBCB 235 de *Beauveria bassiana* para o controle de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) em laboratório. **Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1/2, p. 25-82, jan./dez., 2006.

GLARE, T. R. Molecular characterisation in the entomopathogenic fungal genus *Beauveria*. **Laimburg Journal**, v. 1, p. 286-298, 2004.

GLARE, T. R.; Reay, S. D.; Nelson, T. L. & Moore, R. *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. **Mycological Research**, .v. 112, p. 352-360, 2008.

GOETTEL, M.S.; POPRAWSKI, T.J.; VANDENBERG, J.D. et al. Safety of non-target and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415–2457. 2007.

GOLDSTEIN, D. B.; LINARES, A. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W.. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. **Genetics**, v. 139, p. 463–471, 1995.

GUEVARA, L. A. C. & WIEND, F. M. Aspectos da biologia, em condições de campo, da broca da cana-de-açúcar. **Agropecuária Técnica**, v. 1, n. 1, p. 32-39, 1980.

GUEVARA, L. A. C. Frequência de Cópula da *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepdoptera: Crambidae) em condições de campo e laboratório. **Agropecuária Técnica**, v. 1, n. 1, p. 24-31, 1980.

GUIMARÃES, A. M., PAZ, I.C.P., SOUZA, A.S., SANTIN, R.C.M., SILVA, M.E., MATSUMURA, A.T.S. **Compatibilidade entre *Trichoderma* spp., *Paecilomyces lilacinus* e *Bacillus amyloliquefaciens* em inoculação conjunta no solo** Anais 13º Siconbiol 2013

GRIGORIEV, IGOR V. 2011 **Sample records for fungal genomics platform** Disponível em <<http://www.science.gov/topicpages/f/fungal+genomics+platform.html>> acesso em 14 de out de 2015

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interaction between fungal pathogens and insects host. **Ann. Rev. Entomol**, v. 39, p. 293-322, 1994.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica** 4(1): 9pp.

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

IDURY, R.M. & CARDON, L.R. A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Res*, v. 7, p. 1104–1109, 1997.

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

INSETICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. The IRAC e-Classification: an interactive mode of action (MoA) tool. Disponível em: < <http://www.irac-online.org/eclassification/>> Acesso em: 15 jul. 2015.

ISHII, S.T.; NAKAMURA, S.; OZAWA, A.; KOBAYASHI, D.; SANO, S.; OKABE.. Water quality monitoring and risk assessment by simultaneous multipathogen quantification. *Environ. Sci. Technol.* 48:4744-4749, 2014.

ISHII, S.T.; SEGAWA, S.; OKABE. Simultaneous quantification of multiple food and waterborne pathogens by use of microfluidic quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:2891-2898, 2013.

JACKSON, C. W.; HEALE, J. B. & HALL, R. A. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella samborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. . In: S.B. Alves (ed.), *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba, FEALQ, 1998 p. 289-370.

JENKINS, J. B. 1990. *Human Genetics*. 2da Ed. Nueva York. Harper y Row. 461 p.

JUÁREZ, O.; GUERRA, G.; VELÁZQUEZ, I.; FLORES-HERRERA, O.; RIVERA-PÉREZ, R. E. & PARDO, J. P. The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *FEBS J*, v. 273, p. 4603–4615, 2006.

KELLY CRISTINA CANCELA. **Conceitos, Terminologia, Descrição e Caracterização de Agente.** Disponível em <http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public_html/contbio01.html> Acesso em 17 de set de 2015>

KENT W. J. **BLAT--the BLAST-like alignment tool.** *Genome Res* 2002, 12:656-664.

KEPLER, R.M. & REHNER, S.A. Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Mol Ecol Resour* 13: 210–217, 2013.

KEPLER, R.M.; SUNG, G.H.; BAN, S.; NAKAGIRI, A.; CHEN, M.J.; HUANG, B.; LI, Z.; SPATAFORA, J.W.: New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps*. *Mycologia*. V.104, p. 182-197, 2012.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the fungi.**

KOBAYASI Y, SHIMIZU D. *Cordyceps* species from Japan: 4. **Bull Nat Sci Mus Tokyo**, v. 8, p. 79–91, 1982.

KOUASSI, M.. Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Universidad de Québec, Montreal, Canada. Vertigo. **La revista en ciencias ambientales de la web**. 2001. Consultado 02 julho 2015. Disponible en: <http://vertigo.revues.org/4091>

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, Marília, v.19, p. 683689, 1997.

LANGEWALD, J.; OUAMBAMA, Z.; MAMADOU, A.; PEVELING, R.; STOL, I.; BATEMAN, R.; ATTIGNON, S.; BLANFORD, S.; ARTHURS, S.; LOMER, C. Comparison of an organophosphate insecticide with a mycoinsecticide for the control of *Oedaleus senegalensis* (Orthoptera: Acrididae) and other *Sahelian grasshoppers* at an operational scale, **Biocontrol Science and Technology**, 9, 199-214, 1999.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribierão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92p.

LEXA M, HORAK J, BRZOBOHATY B. **Virtual PCR**. *Bioinformatics* 2001, 17:192-193.

LIEVENS, B.; BROUWER, M.; VANACHTER, A. C. R. C.; LÉVESQUE, C. A.; CAMMUE, B. P. A.; THOMMA, B. P. H. J. Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA macroarray. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.

LI Z, LI C, HUANG B, FAN M.. Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. **Chinese Sci Bull**, v. 46, p. 751–753, 2001.

LI, J.; CAI, Y.; LUAN, F.; WANG, B.; LI, Z. Population genetic structure of *Beauveria bassiana* from South and Southwest Anhui sericultural regions: ISSR analysis. **Chin. J. Appl. Ecol**, v. 21, p. 3239–3247 (in Chinese), 2010.

LIANG, Z. Q.; LIU, A. Y.; LIU, Z. Y. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. **Acta. Mycol. Sinica**, v. 10, p. 257–262, 1991

LIMA FILHO, M. & J.O. G. LIMA. Massa de ovos de *Diatraea saccharallis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de campo. Apud PARRA, J.R.P.;

LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; LIU, A. Y.; YAO, Y. J.; HYDE, K. D.; YU, Z. N. Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences. **Mycol. Res**, v. 106, p. 1100–1108, 2002.

LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J. S.; LIU, A. Y.; YAO, Y. J. A new species of *Beauveria*, the anamorph of *Cordyceps sobolifera*. **Fungal Diversity**, v. 7, p. 61–70, 2001.

LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J. S.; YAO, Y. J.; LIU, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **J. Invertebr. Pathol**, v.78, p. 178–182, 2001.

LOMER, C. J.; BATEMAN, R. P.; JOHNSON, D. L.; LANGEWALD, J.; THOMAS, M. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 667-702, 2001.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; OLIVEIRA, A. V.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores Moleculares Dominantes (Rapl e Aflp). *Biociência*, n. 29, p. 56-60. Disponível em: <<http://www.biociencia.com.br/revista/bio29/marcadores.pdf>> Acesso em: 25 set. 2015.

LOPES, L.B.; MESQUITA, A.L.M.; TIGANO, M.S.; SOUZA, D.A.; MARTINS, I.; FARIA, M. Diversity of indigeneous *Beauveria* e *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.

LOUREIRO, E. de S.; MOINO J. R., ARNOSTI, A.; SOUZA, de G. C. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.31, n.2, p.263-269, 2002.

LOUREIRO, E.S. **Seleção e avaliação de campo de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Para o controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemíptera: Cercopidae).** 2004. 91f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2004.

LUPATINI, MANOELI; MELLO, ANDREA HENTZ DE AND ANTONIOLLI, ZAIDA INÊS. Caracterização do dna ribossômico do isolado de *Scleroderma* UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex- maiden. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. 2008, vol.32, n.spe, pp. 2677-2682.

MAC LEOD, D.M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. **Canadian Journal of Botany**, v.32, n.6, p.818-890, 1954.

MACEDO, N.; LAVORENTI, N. Novo método de amostragem de intensidade de infestação da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). **STAB**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 32-41, 2004.

MACLEOD, D. M. Investigations of the genera *Beauveria* Vuill. And *Tritirachium* Limber. **Canadian Journal of Botany**, v.32, p.818-890, 1954.

MAPA/AgrofitI, 2010. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins. Acesso em: 25 set. 2015.

MARQUES, M. O. et al. **Tópicos em tecnologia sucroalcooleira**. Jaboticabal: Multipress, 2006. 191 p.

MARRONE, P. G. 2007 **Barriers to adoption of biological control agents and biological pesticides**. CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources, vol. 2, no. 15. Wallingford, UK: CABI Publishing.

MARTINS, J.F. da S.; TCACENCO, F.A.; MATTOS, M.L.T. Patogenicidade de *metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris stal* (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v.74, n.2, p.141-148. 2007.

MAUER, P.; COUTEAUDIER, Y.; GIRARD, P. A.; BRIDGE, P.A.; RIBA, G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol Res*, v. 101, p. 159–164, 1997.

MCGUIRE, K. J.; MCDONNELL, J. J.; WEILER, M.; KENDALL, C.; MCGLYNN, B. L., WELKER, J. M., AND SEIBERT, J.: The role of topography on catchment-scale water residence time, *Water Resour. Res.*, 41, W05002, 2005.

MENDEGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phitopathology**, v. 34, p. 367-386, 1996.

MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transations of British Mycological Society**, v. 65, p. 473-477, 1980.

MEYLING, N. V. & EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, p. 145-155, 2007.

MEYLING, N. V. *PCR-based methods for characterisation of entomopathogenic fungi*. 2008. Disponível em: <http://orgprints.org/14345/1/D5_2_final.pdf> Acesso em: 21 set. 2015.

MILNER, R. J. Current status of *Metarhizium anisopliae* as a mycoinseticide in Australia. **Biocontol**, n. 21, v. 2, p. 47-50, 2000.

MURPHY K, RAJ T, WINTERS R. S, WHITE P. S. me-PCR: a refined ultrafast algorithm for identifying sequence-defined genomic elements. **Bioinformatics**, v.20, p.588-590, 2004.

NEHMI FILHO, V.A. Cana-de-açúcar: alta do petróleo e vitória da OMC reforçam expectativas altistas. In: FNP CONSULTORIA E AGROINFORMATIVOS. **Agrianual 2005 – Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, p.261-264, 2004.

NING Z, COX A. J, MULLIKIN J. C. **SSAHA: a fast search method for large DNA databases**. *Genome Res* 2001, 11:1725-1729.

ODUM, E.P. 1985. **Ecologia**; trad. Cristopher J. Tribe - Ed. Guanabara (RJ).

OMINSKI, K. H.; BOELT, B. 2005. Evolution of integrated crop–livestock production systems. p. 137–148. In D.A. McGilloway (ed.) Grassland: A global resource. Wageningen Academic Publ., Wageningen, the Netherlands.

ONOFRE, S. B. et al.. Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In. SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biociência: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 2002. p. 297-347.

OULEVEY, C.; WIDMER, F.; KÖLLKER, R.; ENKERLI, J. An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. **Mycol. Res**, v. 113, p. 1016-1024, 2009.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; AZEVEDO, J. L. Natural variability in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Biociência**, v.33, p.657-672, 1990.

PARRA J.R.P.; BOTELHO P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA B.S. BENTO J.M.S. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Ed. Manole, SP. 609p. 2002

PARRA, J.R.P. *et al.* Efeito da nutrição de adultos e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). In: PARRA, J.R.P.; MILANO, P.; CONSOLI, F. L.; ZERIO, N. G.; HADDAD, M. L.; **Efeito da nutrição de adultos e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae)**, A. Soc. Entomol. Brasil 28(1): 49-57 (1999).

PARRA, J.R.P., 2000. O Controle Biológico e o Manejo de Pragas: passado, presente e futuro. In: GUEDES, J.C.; I.D. COSTA; E. CASTIGLIONI, eds. Bases e Técnicas do Manejo de Insetos. UF Santa Maria, RS. p.59-70.

PARRA, J. R. P **Brasil tem oportunidade para controle biológico** <http://agencia.fapesp.br/brasil_tem_oportunidade_para_controle_biologico/20332/> acesso em 02 de dezembro de 2014 -

PATERNIANI, E. Agricultura sustentável nos trópicos. *Estudos Avançados*, v.15, n.43, 2001.

PAULI, G. **Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), *Beauveria bassiana* (Bals.) e vírus da granulose, principais patógenos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae)**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

PEDRAS, M. S. C.; ZAHARIA, L. I.; WARD, D. E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. **Phytochemistry**, v. 59, p. 579-596, 2002.

PEDRO FARIA. **Qualidade, logística e aplicação**. Disponível em <<http://abcbio.org.br/noticias/qualidade-logistica-e-aplicacao/>> Acesso em 10 de Outubro de 2015.

PEKRUL, S. & GRULA, E. A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. . In: S.B. Alves (ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1998 p. 289-370.

PEREIRA, R. M.; STIMAC, J. L.; ALVES, S. B. Soil antagonism affecting the dose-response of workers of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*, to *Beauveria bassiana* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 156-161, 1993.

PETCH, T. Studies in entomogenous fungi. **Transactions of the British Mycological**

PINHEIRO, D. O.; QUAGIO-GRASSIOTO, I.; GREGÓRIO, E. A. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepdoptera: Crambidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 4, p. 413-419, 2008.

PINTO, A. de S. Controle de pragas da cana-de-açúcar. Boletim Técnico. Biocontrol, **Piracicaba**, n.1, 64p, 2006.

POLANCZYK, A.R.; ALMEIDA, L.C.; PADULLA, L.; ALVES, S.B. Pragas de cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. Revista **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p.14-17, 2004.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos Volume II - 1a. edição. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2003. v. 2. 222 p.

RAMPELOTTI, F. T.; FERREIRA, A.; PRANDO, H. F.; GRUTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. da S.; TCACENCO, F. A.; MATTOS, M. L. T. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris stal* (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v.74, n.2, p.141-148. 2007.

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

REAY, S. D.; BROWNBRIDGE, M.; CUMMINGS, N. J.; NELSON, T. L.; SOUFFRE, B.; LIGNON, C. & GLARE, T. R. Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation forests. **Biological Control**, v. 46, p. 484-494, 2008.

REHNER, S.A.; BISCHOFF; J. F., HUMBER, R. A. Web-based Molecular phylogenetic identification resources for *Beauveria* and *Metarhizium*. Anais [41st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology](#). Disponível em <<https://www.ent.iastate.edu/sip/2008/node/217>> Acesso em 10 de outubro de 2015.

REHNER, S. A. & BUCKLEY, E. P. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 409-411, 2003.

REHNER, S.A. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: VEGA, F.E.; BLACKWELL, M. Insect-fungal Association Ecology and Evolution. **New York: Oxford University Press**, 2005.

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

REHNER, S.A.; POSADA, F.; BUCKLEY, E.P.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; VEGA, F.E. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 11-21, 2006.

REZENDE, J. M; ZANARDO, A. B. R.; DA SILVA L. M.; DELALIBERA, I; REHNER, S. A. . Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. **BioControl** (Dordrecht) , v. 60, p. 495-505, 2015.

ROBERTS, D. W. Toxins of entomopathogenic fungi. In: Microbial Control of Pest and Plant Diseases. **Burges (ed.). Academic Press, NY**, p. 441-465. 1981

ROCHA LF, INGLIS PW, HUMBER RA, KIPNIS A, LUZ C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **J Basic Microbiol**, v.52, p.1–10, 2012

RODRIGUES, A. M.; LOUREIRO, E. S. Confecção de uma coleção de fungos entomopatogênicos com isolados encontrados em culturas agrícolas e ambientes de preservação ambiental em Mato Grosso do Sul. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v.76, n.2, p.303-306. 2009.

ROUCHKA E. C, KHALYFA A, COOPER N. G. **MPrime: efficient large scale multiple primer and oligonucleotide design for customized gene microarrays**. **BMC Bioinformatics** 2005, 6:175.

SAMSON R. A.; EVANS, H. C. Two new *Beauveria* spp. from South America. **J Invert Path**, v. 39, p. 93–97, 1982.

SAMUELS, R.I.; CORACINI, D.LA.; MARTINS DOS SANTOS, C.A.; GAVA, C.A.T. Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, v.23, p.269-273, 2002.

SANDINO, D. V. M. 2003. **Manejo integrado de la salivita de la caña de azúcar**. Nicaragua. FUNICA/UNA/CATIE, 26p.

SANTOS, D. C.; GREGÓRIO, E. A.; MORAES, R. L. M. S. Programmed cell death during early oogenesis in the *Diatraea saccharalis* germarium. **Acta Microscopia**, v. 16, n. 1-2, p. 311-312. 2007.

SASSNER, P.; MARTENSSON, C. G.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Steam pretreatment of H₂SO₄- impregnated salix for the production of bioethanol. **Bioresour Technol** 2008;99:137–45.

SCHNEIDER, S.; REHNER, S. A.; WIDMER, F.; ENKERLI, J. A PCR-based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 106–114, 2011.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W. Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc Natl Acad Sci U S A.**; 109 (16): 6241-6, 2012 Apr 17.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. **Nature Biotechnology** 18: 233-234, 2000.

SCHWARZENBACH, K.; WIDMER, F.; ENKERLI, J. Cultivation-independent analysis of fungal genotypes in soil by using simple sequence repeat markers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6519-6529, 2007:

SEELKE, C. R.; YACOBUCCI, B. D. Ethanol and other biofuels: potential for US–Brazil energy cooperation. CRS Report for Congress, Order Code RL34191, Washington, DC, September 27; 2007.

SEIFERT, K.A. Progress towards DNA barcoding of fungi. **Molecular Ecology Resources** 9: 83–89, 2009.

SEGATO, S. V.; PINTO, A de S.; JENDIROBA, E.; NOBREGA, J. C. M de. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Alexandre de Sene Pinto, 2006, 415p.

SEGERS, G. C.; HAMADA, W.; OLIVER, R. P.; SPANU, P. D. Isolation and characterization of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Mol Gen Genet**, v. 261, p. 644–652, 1999.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467, 1977.

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

SHIMAZU M.; MITSUHASHASHI W.; HASHIMOTO H.. *Cordyceps brongniartii* sp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. **Trans Myc Soc Jap**, v. 29, p. 323–330, 1988.

SCHULER, G. D. **Sequence mapping by electronic PCR**. *Genome Res* 1997, 7:541-550.

SIEVERS, F. and WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T.J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; and others; Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology** 7(1), 2011

SILVA, G.C. ;XAVIER, B.T.L.;GOULART, D.F.;COSTA, J.C.;OLIVEIRA, J.F.;MUSSER, R.S. Produtos e Subprodutos da cana-de-açúcar. Disponível em: http://www.enapet.ufsc.br/anais/PRODUTOS_E_SUB_PRODUTOS_DA_CANA_DE_A_CUCAR_O_PET_AGRONOMIA_UFRPE_E_O_AGRONEGOCIO_NUMA_ACAO_DE_EXTENSAO.pdf Acesso em 26 de abril.2015.

SILVEIRA, W. D. **Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN.** Piracicaba, 1983. 153p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo.

SIMI, LUCAS DETOGNI. **Susceptibilidade das fases do ciclo de vida de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) à ação de fungos entomopatogênicos.** 2010. xvii, 45 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94900>>

SMITH, R. J.; GRULA, A. Toxic components on the larval surface of the com earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana* . **J. Invertebr. Pathol**, v. 39, p. 15-22, 1982.

SRINIVASAN, R. 2012. **Integrating biopesticides in pest management strategies for tropical vegetable production.** *Journal of Biopesticides*. **1**(2): 36-45.

STEINWENDER, B.M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; THORUP-KRISTENSEN, K.; MEYLING, N.V. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. **J. Invertebr. Pathol.** 123, 6–12, 2014.

ST LEGER, R. J.; BUTT, T. M. “Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.” **Exp. Mycol**, v. 13, p. 274-288, 1989a

ST LEGER, R. J.; FRANK, D. C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem*,v. 204, p. 991-1001, 1992a.

ST LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W. & STAPLES, R. C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. In: S.B. Alves (ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1998 p. 289-370.

ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 93, p 6349-6354. 1996.

ST LEGERR, . J.; CHARNLEAY, K. & COOPERR, M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi : mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 295-302. 1986 b.

ST. LEGER, R. 1993. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. In: Parasites and Pathogens of Insects. Vol. 2, Pathogens. N. E. Beckage and B. Federici (eds.). Academic Press, New York, pp. 211-230.

ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Gen. Microbiol**, v. 136, p. 1779-1789. 1990.

ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W.; AND STAPLES, R. C. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol**, v. 51, p. 299-310, 1991b

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

SUNG G. H.; SPATAFORA J.W.; ZARE R; HODGE K.; GAMS W. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. II. Phylogenetic analysis of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the *Clavicipitaceae*. **Nova Hed**, v. 72, p. 311–328, 2001.

SUNG, G. H.; HYWEL, J. N. L.; SUNG, J. M.; LUANGSA, A. J. J.; SHRESTHRA, B.; SPATAFORA, J. W.. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *Clavicipitaceous* fungi. **Stud Mycol**, v. 57, p. 1–59, 2007.

TAKATSUKA, J. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-simples equence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. **Applied Entomology and Zoology**, v. 42, p. 563-571, 2007.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.10, p. 512-526, 1993.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**. 2011;28:2731–2739.

TINLINE, R. D.; NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**, v. 63, p. 701-712, 1971.

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

USDA. Sugar: world production supply and distribution; 2009. Cardona CA, Sanchez OJ. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresour Technol** 2007;98:2415–57.

VALADEZ, E.; KAHL, Y. G. 2000. *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Universidad Autónoma Chapingo. México.

VALENTE, E. C. N. **Efeito de fungos entomopatogênicos sobre formas imaturas de *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae)**. Recife – PE, 2011. 44p.

Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

VEEN, K. H. & FERRON, P. A selective médium for the isolation of *Beauveria tene/la* and of *Metarrhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, p. 268-269. 1966.

VEY, A. J.; FARGUES, J. E. T.; ROBERT, P. Histological and ultrastructural studies of factors determining the specificity of pathotypes of the fungus *Metarrhizium anisopliae* for scarabeid larvae. **Entomophaga**, v. 27, p. 387-397, 1982.

VIAUD, M.; COUNTEAUDIER, Y.; RIBA, G. Molecular analysis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 64 , v. 1, p. 88-93, 1998.

VICTORIANO & GREGÓRIO, E. A. Ultrastructural of the Lyonet's glands in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepdoptera: Pyralidae). **Biocel**, v. 28, n. 2, p. 165-169, 2004.

VUILLEMIN, P. *Beauveria*, nouveau genre de *Verticilliacies*. **Bulletin de la Société** Wallingford: CAB International, 2001.

WANG, C.; GAN, H.; ST LEGER, R. J. Differential gene expression by *Metarrhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genet. Biol.**, v. 42, p. 704-718, 2005.

WEISER, J. *Beauveria* Vuill. In: Nemoci hmyzu. Naklad. Ceskoslov. **Akademie, Praha**, pp. 361-377, 1972.

WELKER, B. L.; SEIBERT, J. M.; J. The role of topography on catchment-scale water residence time, **Water Resour. Res.**, v. 41, p. W05002, 2005.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, San Diego, 1990, p. 315-322.

WONG, H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. Tese de Doutorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemanha. N 147 p.

XU D, LI G, WU L, ZHOU J, XU Y: **PRIMEGENS: robust and efficient design of gene-specific probes for microarray analysis**. *Bioinformatics* 2002, 18:1432-1437.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol Ecol**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZHANG Z, SCHWARTZ S, WAGNER L, MILLER W. **A greedy algorithm for aligning DNA sequences**. *J Comput Biol*, 7:203-214,2000.

ZAPPELLINI, L.O.; ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. & GIOMETTI, F. H. C. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Arq. Inst. Biol**, v. 77, p. 75-82, 2010.