

ELAINE CRISTINA VICENTE BOVI

**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)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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

São José do Rio Preto
2012

ELAINE CRISTINA VICENTE BOVI

**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)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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.

Banca Examinadora

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

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo
IAC – Campinas

Prof. Dr. Éder Antônio Giglioti
EMBRAPA – Brasília

São José do Rio Preto
20/abril/2012

Dedico 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.

Ao meu namorado Leonardo, por ser o meu maior incentivador deste trabalho.

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.

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 cinco 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 e pelos almoços de trabalho.

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 mestrado.

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 mestrado e me capacitar.

Aos amigos do Laboratório de Produção de Agentes Biológicos – Bioenergia do Brasil S/A, em especial Ellen Evelin Fagundes, André Luiz Lozano, José Roberto

Monteiro e Francine Morini pela colaboração, apoio, carinho, dedicação, incentivo e por estarem ao meu lado em horas difíceis e alegres.

A professora Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, da Faculdade de Ciências Agrárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, por ter disponibilizado o uso do Sequenciador para a genotipagem das minhas amostras e em especial as alunas Andressa e Michele pela colaboração e dedicação durante o período de execução das genotipagens.

Ao pesquisador e Prof. Dr. Carlos Colombo e a Profa. Dra. Regina Priolli do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) pela atenção e por me auxiliarem nas dúvidas no momento das análises.

A professora Dra. Maria Imaculada Zucchi, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ-USP por ter me recebido de portas abertas em seu grupo de pesquisa para me ajudar nas análises de diversidade genética populacional. Agradeço em especial ao seu aluno de doutorado Miklos Maximiliano Bajay, primeiramente por sua atenção e dedicação e por ter me ajudado em todas as análises, rodando todos os programas de análise de diversidade genética necessários e ainda me auxiliando na discussão dos resultados. 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.

Aos “meninos” da SMARTBIO, Dônavam e Cristiano pela amizade, dedicação e por me auxiliarem nas análises estatísticas.

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 mestrado comigo, em especial a Márcia Morety por ter me acolhido, pela amizade e me ajudado sempre com bons conselhos e a Carolina Bezerra por ter me auxiliado na realização de toda a parte experimental, pela amizade e incentivo.

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 de nos forneceu e pelo exemplo de vida que são para mim. Essa vitória é fruto da dedicação de vocês! A meus irmãos, Geovane e Eliara 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.

Agradeço de forma especial o amor da minha vida, Leonardo Carrenho, pois sem o seu incentivo e apoio incondicional nada seria possível. Obrigada pelo companheirismo sem medida, pelo carinho, pela acolhida, dedicação e por ter sido sempre o meu maior incentivador. Amo você! Também agradeço sua família, que é maravilhosa, por todo o incentivo.

Aos amigos de sala, como Catierine, ou aqueles que não estavam presentes nas salas de aulas, nem nos experimentos, mas que muito me ajudaram ou que fizeram parte dessa fase da minha formação em especial a minha “cumadre” Franciele.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A broca da cana-de-açúcar é considerada como uma das principais pragas da cultura, cujo controle químico não tem sido muito 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 de São Paulo e Centro-Oeste potencializam a utilização dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle desta praga. O presente trabalho teve como objetivo estudar as variações dentre as populações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* provenientes de diferentes regiões do Brasil e hospedeiros associadas ao controle da *Diatraea saccharalis* e identificar microrganismos com potencial de uso como agentes para o controle desta praga. Neste sentido, foram realizados isolamentos de fungos de amostras de solos de diferentes culturas e regiões do Brasil e hospedeiros. Destas amostras, após análises morfológicas, foram obtidos 55 isolados de *B. bassiana* e 14 isolados de *M. anisopliae*. Isolados provenientes de Institutos de Pesquisa e Empresas privadas foram fornecidos para serem utilizados como referências, totalizando 73 isolados de *B. bassiana* e 68 isolados de *M. anisopliae*. Os isolados foram inicialmente caracterizados quanto ao potencial de patogenicidade, sendo avaliados quanto a capacidade de infectividade sobre todas as fases de desenvolvimento da *D. saccharalis*. Os resultados do presente estudo demonstraram que ovos, lagartas, crisálidas e adultos de *D. saccharalis* são suscetíveis à infecção por diversos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Foi possível ainda caracterizar a patogenicidade de diversos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, comprovando que estes entomopatogênicos apresentam potencial de controle sobre todas as fases de desenvolvimento deste inseto-praga. Em seguida, buscou-se investigar a diversidade genética destes isolados, avaliar a distribuição espacial de genótipos, conhecer a relação genética entre os isolados das diferentes regiões do Brasil, diferentes hospedeiros e ainda a relação com o potencial de patogenicidade. Para esta finalidade, os isolados foram submetidos a genotipagens com a técnica de PCR com marcadores microssatélites. Com o programa STRUCTURE 2.3 foi possível a estruturação genética

dos isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp sendo alocados em grupos genéticos semelhantes. Os oito marcadores SSR utilizados permitiram a detecção de 40 e 42 haplotipos nas coleções de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp respectivamente, indicando alta diversidade genética. De acordo com os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA), 63,02% e 74,69% da variabilidade genética total foi explicada pela variação entre os grupos, enquanto a variância dentro dos grupos foi responsável por apenas 36,98% e 25,31% para *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp., respectivamente. O índice de fixação (F_{st}) foi igual a 0,63 e 0,74, indicando que houve elevada variabilidade genética entre os isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp., respectivamente, principalmente entre os grupos formados.

Os resultados indicam que os marcadores SSRs apresentam alta capacidade para identificação de isolados (haplotipos) e caracterização de coleções de isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. Além disso, se constituem em 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 e evitar contaminações e/ou mutações e monitorar produtos para evitar a clonagem de seus isolados superiores. A utilização dos SSRs pode assumir uma dimensão ainda maior a nível nacional e governamental para o registro de isolados e de produtos técnicos ou produtos formulados e monitorar a biodiversidade de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. e sua exploração para o controle de insetos pragas.

Palavras chave: controle-biológico, *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Diatraea saccharalis*.

ABSTRACT

The sugarcane borer is considered a major crop pest, whose chemical control has not been very effective. Biological control with *Cotesia flavipes*, due to the expansion of the plantation will not be enough to control in areas of high infestation. The hot and humid climate of Northwest region of São Paulo and the Midwest potentiate the use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control this pest. The present work aimed to study the variations among populations of *B. bassiana* and *M. anisopliae* from different regions of Brazil and hosts associated with the control of *Diatraea saccharalis* and identify microorganisms with potential use as agents to control this pest. In this sense, fungal isolations were made of soil samples from different cultures and regions of Brazil and hosts. From these samples, after morphological analysis, we obtained 55 isolates of *B. bassiana* and 14 isolates of *M. anisopliae*. Isolates from research institutes and private companies were provided for use as references, totaling 73 isolates of *B. bassiana* and 68 isolates of *M. anisopliae*. The isolates were initially characterized for their pathogenic potential and they were evaluated for their ability to infectivity on all phases of development of *D. saccharalis*. The results of this study show that eggs, larvae, pupae and adults of *D. saccharalis* are susceptible to infection by several isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana*. It was also possible to characterize the pathogenicity of different isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana*, confirming that these entomopathogenics have potential control over all stages of development of this pest insect. Then, we sought to investigate the genetic diversity of these isolates, to evaluate the spatial distribution of genotypes, to know the genetic relationship between isolates from different regions of Brazil, different hosts and even the relationship with the potential for pathogenicity. For this purpose, the isolates were subjected to genotyping with the PCR techniques with microsatellite markers. With the program STRUCTURE 2.3 was possible the genetic organization of isolates of *Metarhizium* sp. and *Beauveria* sp and divided into similar genetic groups. The eight SSR markers used allowed the detection of 40 and 42 haplotypes in the collections of *Metarhizium* sp. and *Beauveria* sp respectively, indicating high genetic diversity. According to the results of the Analysis

of Molecular Variance (AMOVA), 63.02% and 74.69% of total genetic variability was explained by the variation between groups, while the variance within groups accounted for only 36.98% and 25.31% to *Metarhizium* sp. and *Beauveria* spp. respectively. The Fixation Index (F_{st}) was equal to 0.63 and 0.74, indicating that there was high genetic variability among isolates of *Metarhizium* sp. and *Beauveria* sp. respectively, mainly among the groups. The results indicate that the SSR markers have high capacity for identification of isolates (haplotypes) and characterization of collections of isolates of *Metarhizium* sp. and *Beauveria* spp. Moreover, they form an excellent tool for the establishment of control programs in genetic identity in the biofactories that can use the technique to control the quality of their commercial production and avoid contamination and / or mutations, as well as monitoring products to prevent the cloning of its upper isolated. The use of SSRs can assume an even greater national and government dimension for the registration of isolates and technical or formulated products, and to monitorize the biodiversity of *Metarhizium* sp. and *Beauveria* sp. and its exploitation for the control of pest insect

Keywords: biological control, *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Diatraea saccharalis*.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	13
2 - OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos gerais:	19
2.2 Objetivos específicos:	19
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 A importância da Cana-de-açúcar no Brasil	20
3.2 A Broca da Cana-de-açúcar.	22
3.2.1 Importância	22
3.2.2 Biologia	23
3.2.3 Controle de <i>Diatraea saccharalis</i>	25
3.3 <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin.....	29
3.3.1 Classificação Taxonomica	29
3.3.2 Morfologia e Ciclo de Vida de <i>Beauveria bassiana</i>	31
3.3.3 Mecanismo de Ação e Agressividade	33
3.4 <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
3.4.1 Classificação Taxonômica	34
3.4.2 Morfologia e Ciclo de Vida <i>Metarhizium anisopliae</i>	38
3.4.3 Mecanismo de infecção e agressividade de <i>Metarhizium anisopliae</i>	41
3.5 Gama de Hospedeiros	44
3.6 Variabilidade Genética dos Fungos Entomopatogênicos.....	45
3.7 Especificidade por Hospedeiros	47
3.8 Variabilidade Patogênica	49
3.9 Técnicas de Caracterização Molecular dos fungos entomopatogênicos	50
CAPÍTULO I	57
" Isolamento e Manutenção dos isolados de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metarhizium</i> sp."	
1-INTRODUÇÃO	58
2-MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Isolamento de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metarhizium</i> sp. de amostras de solo, insetos e produtos comerciais.....	59
2.2 Obtenção de isolados fúngicos a partir de insetos	60
2.3 Obtenção de isolados fúngicos a partir de amostras de solo.....	60
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1 Coleta e isolamento de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metarhizium</i> sp.	61
CAPÍTULO II.....	69
" Avaliação da Virulência de Isolados de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metarhizium</i> sp. sobre todas as Fases do Ciclo de <i>Diatraea saccharalis</i> ."	
1- INTRODUÇÃO	70
2-MATERIAL E MÉTODOS	70

2.1 Local de execução dos experimentos.....	70
2.2 Isolados estudados.....	71
2.3 Obtenção dos indivíduos de <i>Diatraea saccharalis</i>	71
2.4 Preparo das suspensões de inóculo e viabilidade dos conídios.....	71
2.5 Avaliação da virulência de isolados de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metarhizium</i> sp. sobre ovos, lagartas, crisálidas e adultos de <i>Diatraea saccharalis</i>	72
2.6 Avaliação da virulência sobre massas de ovos.....	73
2.7 Avaliação da virulência sobre lagartas.....	73
2.8 Avaliação da virulência sobre crisálidas.....	73
2.9 Avaliação da virulência sobre adultos.....	74
2.10 Agrupamento por Similaridade.....	74
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
3.1. Avaliação da virulência de isolados de <i>Beauveria</i> sp.	74
3.1.1 Avaliação da virulência de isolados de <i>Beauveria</i> sp. sobre ovos de <i>D. saccharalis</i>	81
3.1.2 Avaliação da virulência de isolados de <i>Beauveria</i> sp. sobre lagartas de <i>D. saccharalis</i>	82
3.1.3 Avaliação da virulência de isolados de <i>Beauveria</i> sp. sobre crisálidas de <i>D. saccharalis</i>	82
3.1.4 Avaliação da virulência de isolados de <i>Beauveria</i> sp. sobre adultos de <i>D. saccharalis</i>	83
3.2 Avaliação da virulência de isolados de <i>Metarhizium</i> sp.	84
3.2.1 Avaliação da virulência de isolados de <i>Metarhizium</i> sp. sobre ovos de <i>D. saccharalis</i>	89
3.2.2 Avaliação da virulência de isolados de <i>Metarhizium</i> sp. sobre lagartas de <i>D. saccharalis</i>	90
3.2.3 Avaliação da virulência de isolados de <i>Metarhizium</i> sp. sobre crisálidas de <i>D. saccharalis</i>	91
3.2.4 Avaliação da virulência de isolados de <i>Metarhizium</i> sp. sobre adultos de <i>D. saccharalis</i>	92
3.3 Avaliação da virulência de isolados de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metarhizium</i> sp. sobre ovos, lagartas, crisálidas e adultos de <i>Diatraea saccharalis</i>	93
3.4 Agrupamento por Similaridade.....	96
CAPÍTULO III.....	100
"Caracterização Molecular de Isolados de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metarhizium</i> sp."	
1-INTRODUÇÃO.....	101
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	102
2.1 Local de execução dos experimentos.....	102
2.2 Isolados estudados.....	103
2.3 Extração e Quantificação de DNA.....	103
2.4 Reação de PCR.....	104
3.3.4 Caracterização e Genotipagem dos Microssatélites.....	108
3. RESULTADOS.....	110
3.1. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE <i>Beauveria</i> sp.....	110

3.1.1. Frequência e distribuição de alelos em <i>Beauveria</i> sp.....	110
3.1.2. Agrupamento dos isolados de <i>Beauveria</i> sp.....	111
3.1.3. Variabilidade e Diversidade Genética de <i>Beauveria</i> sp.	113
3.1.3. Estrutura Populacional de <i>Beauveria</i> sp.....	114
3.1.4. Correlação entre Distância Genética e Patogenicidade dos isolados de <i>Beauveria</i> sp.....	116
3.2.1. Frequência e distribuição de alelos em <i>Metarhizium</i> sp.	127
3.2.2. Agrupamento dos isolados de <i>Metarhizium</i> sp.	128
3.2.3. Variabilidade e Diversidade Genética de <i>Metarhizium</i> sp.....	130
3.2.4. Estrutura Populacional de <i>Metarhizium</i> sp.....	131
3.2.5. Correlação entre Distância Genética e Patogenicidade dos isolados de <i>Metarhizium</i> sp.	134
CONCLUSÕES GERAIS	146
CONSIDERAÇÕES FINAIS	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos isolados de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metathizium</i> sp. obtidos de coletas de solos em culturas agrícolas e insetos de diferentes regiões.	62
Tabela 2 - Relação dos isolados de <i>Beauveria</i> sp. obtidos de Empresas.	63
Tabela 3 - Relação dos isolados de <i>Beauveria</i> sp. obtidos de Instituição de Pesquisa.	63
Tabela 4 - Relação dos isolados de <i>Beauveria</i> sp. obtidos de coletas de solos agrícolas.	64
Tabela 5 - Relação dos isolados de <i>Beauveria</i> sp. obtidos de insetos de diferentes regiões.	65
Tabela 6 - Relação dos isolados de <i>Metathizium</i> sp. obtidos de Empresas.	65
Tabela 7 - Relação dos isolados de <i>Metathizium</i> sp. obtidos de Instituição de Pesquisa.	66
Tabela 8 - Relação dos isolados de <i>Metathizium</i> sp. obtidos de coletas de solos em culturas agrícolas de diferentes regiões.	67
Tabela 9 - Relação de todos os isolados de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metathizium</i> sp. obtidos no trabalho relacionados com sua origem.	67
Tabela 10. Pesos atribuídos para analisar quantitativamente a eficiência da capacidade de infecção dos diferentes isolados de <i>Beauveria</i> sp e <i>Metarhizium</i> sp considerando todas as fases do ciclo de <i>Diatraea saccharalis</i>	72
Tabela 11. Percentuais de infectividade de diferentes isolados de <i>Beauveria</i> sp. em diferentes fases do ciclo de <i>Diatraea saccharalis</i> , 10 dias após exposição. Experimento realizado sob condições controladas de 26°C ± 2 e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.	76
Tabela 12. Variabilidade do Fenótipo dos diferentes isolados de <i>Beauveria</i> sp. em relação a infectividade das diferentes fases do ciclo de <i>Diatraea saccharalis</i> . Experimento realizado sob condições controladas de 26°C ± 2 e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.	78
Tabela 14. Variabilidade do Fenótipo dos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> sp. em relação a infectividade das diferentes fases do ciclo de <i>Diatraea saccharalis</i> . Experimento realizado sob condições controladas de 26°C ± 2 e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.	87
Tabela 15 - Primers microsatellite de <i>Beauveria bassiana</i> : locus identificados (GenBank accession number), padrão de repetição, sequências dos primers forward (F) e reverse (R), tamanhos de alelos clonados (tamanho do intervalo observado entre diferentes espécies; número de alelos observados) em bp (REHNER & BUCKLEY, 2003).	106
Tabela 16 - Sequência dos Primers microsatellites e características dos 14 locos de microsatélites de <i>Metarhizium anisopliae</i> (FREED et al., 2010).	107
Tabela 17 – Grupo de isolados formados pelo programa STRUCTURE 2.3.	119
Tabela 18. Análises de Variância Molecular (AMOVA) resultados e índice de fixação (F_{st}^{θ}) de Sequências Simples Repetidas (SSR) de isolados de <i>Beauveria</i> sp.	123
Tabela 19. Sequência dos Primers de Microsatélites e características dos 8 locos de microsatélites de <i>Beauveria</i> sp.	124
Tabela 20. Diversidade Genética por alelos dos grupos de <i>Beauveria</i> sp. formados pelo STRUCTURE.	124

Tabela 21 – Grupo de isolados formados pelo programa STRUCTURE 2.3.	138
Tabela 22. Análises de Variância Molecular (AMOVA) resultados e índice de fixação (F_{st}^{θ}) de Sequências Simples Repetidas (SSR) de isolados de <i>Metarhizium</i> sp.	142
Tabela 23. Sequência dos Primers de Microssatélites e características dos 8 locos de microssatélites de <i>Metarhizium</i> sp. Primers Microssatélites de <i>Metarhizium</i> sp. locus identificados (Número de acesso do GenBank), padrão de repetição, sequências dos primers forward (F) e reverse (R), temperatura de anelamento, (tamanho do intervalo observado entre diferentes espécies; número de alelos observados) em bp.....	143
Tabela 24. Diversidade Genética por alelos dos grupos de <i>Metarhizium</i> sp. formados pelo STRUCTURE. Os grupos 7, 8 e 9 não possuem valores de diversidade genética, pois possuem apenas um isolado em cada grupo.	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de Vida da <i>Diatraea saccharalis</i> , praga da cana-de-açúcar.	25
Figura 2. Conidiogênese e conídios maduros de espécies <i>Metarhizium</i>	37
Figura 3. Ciclo biológico do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	40
Figura 4. Ciclo de infecção de <i>M. anisopliae</i> sobre o carrapato bovino <i>B. microplus</i> (modificado de ARRUDA, 2005).	40
Figura 5. Percentual dos isolados de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metathizium</i> sp. obtidos das amostras coletadas.	63
Figura 6. Média dos Percentuais de infectividade em todas as fases do ciclo de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>B. bassiana</i>	78
Figura 7. Percentuais de infectividade de ovos de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>B. bassiana</i>	81
Figura 8. Percentuais de infectividade de lagartas de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>B. bassiana</i>	82
Figura 9. Percentuais de infectividade de crisálidas de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>B. bassiana</i>	83
Figura 10. Percentuais de infectividade de mariposas de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>B. bassiana</i>	84
Figura 11. Média dos Percentuais de infectividade em todas as fases do ciclo de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	87
Figura 12. Percentuais de infectividade de ovos de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	90
Figura 13. Percentuais de infectividade de lagartas de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	91
Figura 14. Percentuais de infectividade de crisálidas de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	92
Figura 15. Percentuais de infectividade de adultos de <i>D. saccharalis</i> por diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	93
Figura 16. Dendrograma resultante do agrupamento dos dados de correlação entre a agressividade e distância genética dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp. através de comparação entre as respectivas distâncias Euclidianas.	97
Figura 17. Dendrograma resultante do agrupamento dos dados de correlação entre a agressividade e distância genética dos isolados de <i>Beauveria</i> spp. através de comparação entre as respectivas distâncias Euclidianas.	98
Figura 18 - Eletroferograma do padrão de peso molecular, marcado com ROX e empregado em cada amostra para os cálculos de tamanho alélico em pares de bases (pb). O eixo Y indica a intensidade do sinal de fluorescência e o eixo X número da varredura a laser em que se captou o sinal.	109
Figura 19. Loco Ba 02 e seus padrões de picos gerados pelo software ABI Prism Genotyper versão 2.0 NT (Applied Biosystems) típicos de microsatélites.	110
Figura 20. Histogramas das frequências alélicas dos oito locos de SSR, estimados para todos os isolados de <i>Beauveria</i> spp. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o tamanho do alelo. Barras na cor vermelha indicam alelos raros (frequência menor que 0,05).	117

- Figura 21.** Valores de ΔK para para cada valor de K calculado para os isolados do fungo *Beauveria* spp., de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005). O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo. 118
- Figura 22.** Teste de atribuição para os isolados do fungo *Beauveria bassiana* (K=6). Isolados representados pelas barras verticais coloridas. A mesma cor em isolados diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indica a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. Para a identificação dos isolados (Tabela X). O eixo das cordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo (Q). 118
- Figura 23.** Dendrograma baseado na similaridade de Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA pela análise dos alelos gerados por oito locos SSR de 68 isolados de *Beauveria* spp.. A consistência dos nós foi obtida através de 10.000 reamostragens “bootstrap”. As cores correspondem aos grupos obtidos na análise do Structure. A linha tracejada corresponde à linha imaginária para a separação dos agrupamentos. Algarismos romanos indicam os cinco grupos principais encontrados. 122
- Figura 24.** Gráfico de dispersão por coordenadas principais obtido por SSR e similaridade genética dos 68 isolados *Beauveria* spp. 123
- Figura 25.** Populações (grupos) formadas com o programa STRUCTURE comparando o número de isolados e haplotipos obtidos com os 8 locos estudados. 125
- Figura 26.** Histogramas das frequências de haplotipos obtidos com os oito locos de SSR, estimados para todos os grupos de *Beauveria* spp. 126
- Figura 27.** Loco Ma 164 e seus padrões de picos gerados pelo software ABI Prism Genotyper versão 2.0 NT (Applied Biosystems) típicos de microsatélites. 127
- Figura 28.** Histogramas das frequências alélicas dos oito locos de SSR, estimados para todos os isolados de *Metarhizium* spp. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o tamanho do alelo. Barras na cor vermelha indicam alelos raros (frequência menor que 0,05). 136
- Figura 29.** Valores de ΔK para para cada valor de K calculado para os isolados do fungo *Metarhizium* spp., de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005). O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo. 137
- Figura 30.** Teste de atribuição para os isolados do fungo *Metarhizium* spp. (K=5). Isolados representados pelas barras verticais coloridas. A mesma cor em isolados diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indica a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. Para a identificação dos isolados (Tabela X). O eixo das cordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo (Q). 138
- Figura 31.** Dendrograma baseado na similaridade de Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA pela análise dos alelos gerados por oito locos SSR de 68 isolados de *Metarhizium* spp. A consistência dos nós foi obtida através de 10.000 reamostragens “bootstrap”. As cores correspondem aos grupos obtidos na análise do Structure. A linha tracejada corresponde à linha imaginária para a separação dos agrupamentos. Algarismos romanos indicam os cinco grupos principais encontrados. 141
- Figura 32.** Gráfico de dispersão por coordenadas principais obtido por SSR e similaridade genética dos 68 isolados *Metarhizium anisopliae*. 142
- Figura 33.** Populações (grupos) formadas com o programa STRUCTURE comparando o número de isolados e haplotipos obtidos com os 8 locos estudados. 145

Figura 34. Histogramas das frequências de haplotipos obtidos com os oito locos de SSR, estimados para todos os grupos de *Metarhizium* spp. 145

1- INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e país líder em produção de açúcar e etanol. 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.

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 mais 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 bio-inseticidas 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, como isso, a eficiência do controle pode ser reduzida ou aumentada.

Com base nessas considerações, foi proposto um trabalho com a finalidade de selecionar e estudar as variações entre as populações de *Beauveria bassiana* e *Metharizium anisopliae* associadas ao controle da *Diatraea saccharalis*, provenientes de diferentes regiões geográficas, em sua capacidade de infectar o hospedeiro nas diferentes fases de seu desenvolvimento e selecionar linhagens com maior poder de infecção para uso como agentes de controle biológico. Para tanto, coletas de amostras de solos e de insetos de diferentes regiões geográficas e hospedeiros foram realizadas das quais foram isoladas cepas de *Beauveria bassiana* e *Metharizium anisopliae*

identificadas morfológicamente. Esses isolados foram avaliados quanto a sua virulência, por meio de testes de infectibilidade de todas as fases do ciclo da praga. A variabilidade genética foi estudada por sequenciamento de regiões microssatélites. A partir desses resultados pretende-se selecionar linhagens com elevado potencial de infectibilidade e diferenciá-las com bases naquelas sequências genéticas.

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

O presente trabalho tem como objetivos estudar as variações dentro as populações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* associadas ao controle da *Diatraea saccharalis* e identificar microrganismos com potencial de uso como agentes para o controle desta praga. Para tanto os isolados obtidos serão avaliados quanto a sua virulência e a sua variabilidade genética.

2.2 Objetivos específicos:

Isolamento, identificação e manutenção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a partir de amostras insetos e solos para:

- a) determinação da agressividade dos isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre *Diatraea saccharalis*;
- b) seleção de cepas com alta eficiência de infecção sobre a *D. saccharalis* nas diferentes fases do seu desenvolvimento.
- c) caracterização molecular dos isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* através da técnica PCR usando marcadores moleculares Microssatélites.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A importância da Cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar é uma planta de destaque, muito utilizada no mundo todo, devido a sua capacidade bioenergética e diversidade de produtos obtidos. Sendo assim, ela é elemento fundamental para o desenvolvimento econômico, pois dela derivam o açúcar, o álcool combustível, os fertilizantes e os polímeros. Além disso, através da queima de sua biomassa pode-se gerar energia elétrica. A produção de açúcar a partir da cana-de-açúcar é uma atividade difundida em todo mundo. O cultivo de cana-de-açúcar ocorre predominantemente em climas tropicais e subtropicais, dentro de uma latitude de 35º ao norte e ao sul do equador, e representa aproximadamente 70 a 80% do açúcar total produzido (SILVA, 2010). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e o setor sucroalcooleiro movimenta milhões de reais todos os anos com a produção de açúcar e álcool (GALLO et al.,2002).

Com um total de área de produção de cana-de-açúcar de 8.920mil hectares, o Brasil é capaz de dedicar quase metade da cana colhida para a produção de açúcar, que faz do Brasil o maior produtor mundial de açúcar. A produção de açúcar do Brasil foi contabilizada para 31,85 milhões de toneladas na safra de 2008/2009; outros grandes produtores foram a Índia com uma produção de 16,13 milhões de toneladas e da China com uma produção de 13,32 milhões de toneladas (USDA, 2009). Sobre esses valores, o Brasil é capaz de exportar 68% de sua produção de açúcar, o que o torna o maior exportador de açúcar em todo o mundo com 45% do mercado mundial.

Para o Brasil, a cana é especialmente importante, pois é cultivada em mais de quatro milhões de hectares para a produção de açúcar e álcool. É hoje o País líder na produção de açúcar, na exportação, e em área plantada com cana-de-açúcar, além de ser líder na utilização dessa planta como fonte de energia líquida renovável, o álcool, sendo ainda o único a utilizar este produto de forma exclusiva como combustível alternativo de veículos. Além de acarrear divisas para o País e contribuir para diminuição da poluição ambiental por combustíveis fósseis, a cadeia produtiva da cana-de-açúcar e seus produtos e subprodutos constitui uma importante fonte de distribuição de riqueza e de bem estar para inúmeras comunidades interioranas brasileiras,

contribuindo para a diminuição do êxodo para as metrópoles e de seus conseqüentes problemas sociais (SILVA, 2010).

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*), devido à grande importância que assumiu nos últimos anos por conseqüência da alta produção alcançada, disseminou-se por todos os estados brasileiros, tendo sido conduzida nas mais diferentes condições climáticas, solo, técnicas e tratos culturais. Trata-se de uma cultura de grande importância econômica e social para o Brasil e, em particular, para o Estado de São Paulo, cuja área cultivada é de aproximadamente 3,96 milhões de hectares, com 62% de todo o açúcar e 60% de álcool produzido no país (AGRIANUAL, 2009). Segundo Boiça Junior (1997), apesar da rusticidade que a cultura apresenta, defronta-se com uma série de problemas agrônômicos e, dentre estes, pode-se citar a incidência de pragas e, em particular, a presença acentuada da broca *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera, Crambidae), considerada praga chave da cultura, devido aos grandes prejuízos causados.

Segundo Nehmi Filho (2005), até o ano de 2013 a área total de plantio de cana-de-açúcar deve crescer aproximadamente 48% em relação a área atual, mantendo-se o alto preço do petróleo, o que estimula o investimento e desenvolvimento do setor sucroalcooleiro.

A produção mundial de bio-etanol aumentou de 17,25 bilhões de litros em 2000 para mais de 46 bilhões de litros em 2007. Com todos os novos programas de governo na América, Ásia, Europa, o total global de combustível e a demanda de bio-etanol podem chegar a ultrapassar 125.000 milhões de litros em 2020. Em 2007, a produção de bio-etanol representou cerca de 4% dos 1.300.000 milhões de litros de gasolina consumida globalmente (BALAT 2010)

Os bio-combustíveis podem ser uma alternativa rentável no futuro próximo em muitos países. Atualmente, uma grande quantidade de estudos sobre a utilização de biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de etanol combustível está sendo realizadas em todo o mundo. Para os países onde o cultivo de culturas energéticas é difícil, materiais lignocelulósicos são uma atrativa opção para a produção de bio-combustíveis (CARDONA, 2007). Materiais lignocelulósicos servem como matéria-prima barata e abundante, o que é necessário para produção de etanol combustível a partir

de recursos renováveis a um custo razoável (SASSNER, 2008). Produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos pode diminuir muitas das preocupações ambientais e de alimentos versus combustíveis que é uma das desvantagens da produção de bioetanol a partir de culturas de alimentos como o açúcar ou milho (SEELKE, 2007).

Desta forma, com a sustentação dos preços do petróleo elevados e uma demanda até 2020 de 125 milhões de litros de bio-etanol, haverá a necessidade de uma progressão constante de tecnologia mais eficiente e mais barata. Além de investimentos em bioetanol celulósico, serão necessários também investimentos para o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar com alto teor de sacarose, inteligência no campo e eficiência no controle de pragas, visando a diminuição de perdas e garantindo estratégias para aumentar a disponibilidade de material energético sem aumentar área de plantio.

3.2 A Broca da Cana-de-açúcar.

3.2.1 Importância

A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae), é uma das principais pragas da cana-de-açúcar, estando presente em todos os Estados brasileiros onde se cultiva esta planta. *D. saccharalis* se destaca entre as pragas da cana-de-açúcar devido à sua amplitude de distribuição, intensidade de ataque e grande danos econômicos (CAMPOS; MACEDO, 2004).

Após a eclosão, as lagartas se alimentam do parênquima das folhas, depois se deslocam para a bainha e penetram pela parte mais mole do colmo abrindo galerias de baixo para cima. Isso ocasiona perda de peso na cana e provoca a morte das gemas e falhas na germinação gerando grandes prejuízos diretos. Quando a broca faz galerias transversais, secciona o colmo provocando o tombamento da cana pelo vento. Nas canas novas, a broca produz o secamento dos ponteiros, conhecido como "coração morto". Dentre os prejuízos indiretos destaca-se a penetração de fungos nos orifícios e galerias, abertos pela broca, causando podridão vermelha do colmo. Os fungos *Colleotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme* invertem a sacarose, diminuindo a pureza e dando menor rendimento em açúcar e álcool (POLANCZYK et al.,2004).

Trabalhos desenvolvidos pela ESALQ/USP, COPERSUCAR e UFSCar mostraram que para cada 1% de intensidade de infestação da praga ocorre prejuízos de 0,25% de açúcar, 0,20% de álcool e 0,77% de peso (GALLO et al.,2002). Dados do Centro de Tecnologia Canaveira (CTC) informam que para uma produtividade de 80 toneladas de cana-de-açúcar por hectare, as perdas para cada 1% de infestação da broca são de 616 quilos de cana, 28 quilos de açúcar e 16 litros de álcool.

As perdas em cana-de-açúcar decorrentes do ataque pelo Complexo Broca-Podridões (CBP), associação da praga *Diatraea saccharalis* e dos fungos *Colleotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, são altamente significativas e já foram estimadas em mais de 100 milhões de dólares anuais, somente no Estado de São Paulo. Atualmente, apesar da existência de inimigos naturais e substâncias químicas para o controle da broca, métodos de produção em laboratório dos inimigos naturais, métodos de levantamento da praga, de liberação de inimigos naturais e de avaliação do parasitismo, a eficiência do controle tem sido muito aquém do esperado e do desejado para que se possa efetivamente controlar o CBP em condições de alta favorabilidade ao desenvolvimento da praga e dos fungos (GIGLIOTI, 2008).

3.2.2 Biologia

A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, é um inseto que apresenta desenvolvimento holometabólico, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (LIMA FILHO e LIMA, 2002).

A fêmea de *D. saccharalis* realiza a ovoposição frequentemente na face superior e inferior do limbo foliar, e ocasionalmente na bainha. O número de ovos por postura pode variar de cinco a 50 ovos, podendo cada fêmea ovopositar de 300 a 600 ovos durante seu ciclo de vida. As posturas correspondem a massas de ovos imbricadas, sendo estes achatados e ovais, medindo aproximadamente 1,16 mm de comprimento e 0,75 mm de largura. São inicialmente de coloração branca, tornando-se amarelo com o desenvolvimento e próximo da eclosão adquirem cor enegrecida. O estágio de ovo e os primeiros instares larvais até o início do terceiro instar são os mais suscetíveis a fatores bióticos e abióticos, uma vez que as lagartas estarão mais protegidas dentro do colmo

(FILHO & LIMA, 2002; FALLEIROS et al., 2003; DOSSI et al., 2006; SANTOS et al., 2007; CRUZ, 2007)

De quatro a nove dias após a ovoposição ocorre a eclosão das larvas, que possuem três pares de pernas torácicas, quatro pares de falsas pernas abdominais e um par de falsas pernas anais. Apresentam coloração amarelada, com manchas ou pontuações marrom sobre o corpo e cápsula cefálica de pigmentação marrom. Há relatos de três a dez instares, mas cinco a seis são comuns, e tempo médio da fase larval de 20 a 40 dias dependendo da temperatura, e apresentam comprimento de 2 a 30 mm. A cada ecdise sofrida na fase larval pelas lagartas foram liberadas as cápsulas cefálicas e é possível observar que, à medida a lagarta se desenvolve, a cápsula cefálica também cresce proporcionalmente ao tamanho (VICTORIANO & GREGÓRIO, 2004; PINHEIRO et al., 2008)

Anteriormente à fase pupal, as lagartas recém-nascidas, alimentam-se, no início, do parênquima das folhas, convergindo, a seguir para a bainha. Depois da primeira ecdise, penetram pela parte mais mole do colmo para se alimentar, abrigar e também para posterior saída do adulto. A fase de pupa ocorre dentro do colmo da cana, em um túnel criado pela lagarta. A lagarta limpa e expande um túnel antes da pupação, deixando apenas uma camada de tecido vegetal para a mariposa romper na emergência. A pupa é alongada e fina de coloração marrom-amarelada e marrom escuro, mede entre 16 a 20 mm de comprimento e possui tubérculos pontudos e proeminentes nos segmentos distais. A duração da fase pupal é de oito a nove dias, mas em clima frio pode estender por até 22 dias (CAPINEIRA, 2007). Os adultos são noturnos e apresentam longevidade entre dois a nove dias, morfologicamente apresentam asas anteriores de coloração marrom que se estendem ao longo da mesma. As mariposas medem cerca de 18 a 28 mm de envergadura para os machos e fêmeas com 27 a 39 mm (GUEVARA, 1980; GUEVARA & WIEND, 1980; PARRA et al., 1999).

Nesta espécie, o macho apresenta como característica principal a presença de uma concentração de cerdas no último par de pernas, ausentes na fêmea de acordo com PARRA (2002).

O ciclo evolutivo da *D. saccharalis* (F.) em condições de campo variou de 73 a 102 dias, desde a postura até a emergência dos adultos (GUEVARA & WIEND, 1980). Podem ser observadas 4 ou 5 gerações anuais dependendo das condições climáticas, mas pode ocorrer praticamente durante todo o ciclo da cultura. A duração de cada período do ciclo biológico da broca pode variar em função de fatores climáticos. Na maioria dos locais de ocorrência, *D. saccharalis* esta presente durante todo o ano nos seus diferentes estágios de desenvolvimento: ovo, lagarta de várias idades, crisálida e adultos (FILHO & LIMA, 2001; PARRA et al., 1999).

O conhecimento da biologia de um inseto é de fundamental importância para se desenvolver estratégias de manejo eficientes, dentro dos conceitos do manejo integrado de pragas (PARRA, 2000).

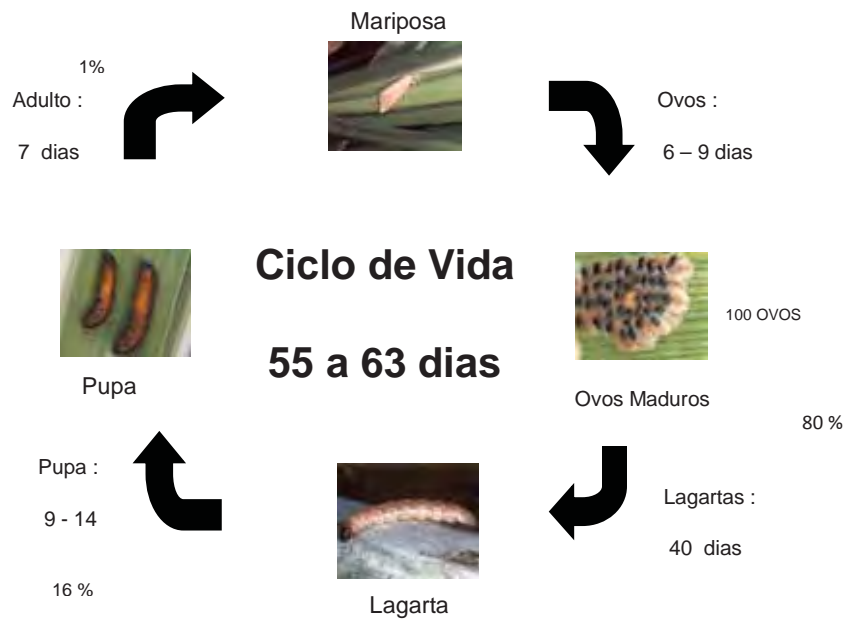


Figura 1. Ciclo de Vida da *Diatraea saccharalis*, praga da cana-de-açúcar.

3.2.3 Controle de *Diatraea saccharalis*

Em virtude dos prejuízos ocasionados pela praga, 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, 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 benzoilurêias e atua inibindo a biossíntese de quitina dos lepdópteros. O fipronil pertence ao grupo dos fenilpirazóis e atua como antagonista dos canais de cloro. O carbofuran pertence ao grupo dos carbamatos e atua como inibidor da acetilcolinesterase (IRAC, 2009).

No entanto este inseto é de difícil controle devido, principalmente, a 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; PINTO, 2006). Nesse sistema, o parasitismo se inicia por uma picada 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 (PINTO, 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 *C. flavipes* foi consolidado a partir da década de 70 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).

Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são mundialmente conhecidos e utilizados como agentes biocontroladores de inúmeras pragas agrícolas. Essas espécies 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 aos fungos *Beauveria bassiana* e *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 *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin

3.3.1 Classificação Taxonomica

Beauveria (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) é um gênero cosmopolita de fungo entomopatogênico. Foi um dos primeiros a ser descoberto pela investigação da muscardine branca, uma doença devastadora que afligiu a indústria europeia do bicho-da-seda nos séculos XVIII e XIX, dando início ao estudo de patologias fúngicas dos insetos. Neste contexto, o cientista italiano Agostino Bassi (1773-1856) deixou significativas e duradouras contribuições à biologia com seus estudos sobre a doença muscardine branca e seu organismo causador (REHNER, 2005).

Balsamo Crivelli (1835) nomeou formalmente o fungo muscardine *Botrytis bassiana* em honra a Bassi, facilitando a comunicação científica e tecnológica sobre o organismo e a doença. Após muitos estudos realizados, verificou-se que as características não eram de *Botrytis*.

Em 1912, Vuillemin descreveu formalmente o gênero *Beauveria* nomeando *Botrytis bassiana* como a espécie tipo *Beauveria bassiana* em reconhecimento a J. Beauverie em 1914 por seus estudos sobre *Beauveria* e a doença muscardine.

Novas espécies de *Beauveria* foram descritas nos séculos XIX e XX, complicando ainda mais a nomenclatura e a identificação dessas espécies. Um total de 49 espécies foi classificada em *Beauveria*, das quais aproximadamente 22 são recentemente consideradas válidas. No entanto, uma sobreposição na variação em tamanho e forma dos conídios tem questionado esta validade e complicado a rotina de identificação das espécies (REHNER, 2005).

Baseado na forma dos conídios, Petch (1926) discerniu com segurança duas espécies e as referiu como *B. bassiana* e *B. densa* (DE HOOG, 1978). Benham & Miranda (1953) consideraram quatro espécies do gênero *Beauveria*: *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *B. effusa* (Beuaverie) Vuillemin, *B. densa* (link) Picard e *B. globulifera* (Spegazzini) Picard.

MacLeod (1954), como Petch, diferenciou diversos espécimes em apenas duas espécies de *Beauveria*, *B. bassiana* e *B. tenella*. Após alguns anos, De Hoog (1972) obteve conclusões similares mas utilizou *B. brongniartii* (Sacc.) Petch para designar as

espécies *B. densa*, nomeado por Petch (1926) e *B. tenella*, nomeado por MacLeod (1954) e, além disso, reconheceu uma nova espécie nomeada *B. alba* (Limber) Saccas. Esta espécie foi posteriormente transferida para *Engyodontium* (Limber) Hoog (DE HOOG, 1978).

Após a análise de De Hoog (1972), várias outras espécies foram descritas na América do Sul. *Beauveria vermiconia* com pequenos conídios em forma de foice (DE HOOG; RAO, 1975), *B. velata* com conídios verrugosos e *B. amorpha* caracterizada por seus largos e cilíndricos conídios (SAMSON; EVANS, 1982). Mais recentemente uma outra espécie de *Beauveria* foi descrita, *B. caledonica*, na Escócia. Também produz conídios cilíndricos similares aos descritos em *B. amorpha* (BISSETT; WIDDEN, 1986).

As seis espécies de *Beauveria* mais distinguíveis e conhecidas são *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. velata* e *B. vermiconia*. É importante também notar que muitas espécies com morfologia similar a *B. bassiana* foram descritas, e são, por isso, consideradas sinônimas para *B. bassiana*: *B. densa*, *B. doryphorae*, *B. effusa*, *B. globulifera*, *B. shiotae*, *B. stephanoderis* e *B. sulfurescens* (REHNER, 2005).

Com base na classificação de Alexopoulos & Mims (1979), o fungo *Beauveria bassiana* encontra-se na seguinte categoria taxonômica:

REINO: Myceteae

DIVISÃO: Amastigomycota

SUBDIVISÃO: Deuteromycotina

CLASSE-FORMA: Deuteromycetes

SUBCLASSE-FORMA: Hyphomycetidae

ORDEM-FORMA: Moniliales

FAMÍLIA-FORMA: Moniliaceae

GÊNERO-FORMA: *Beauveria*

ESPÉCIE-FORMA: *Beauveria bassiana*

Recentemente, estudos moleculares e culturais forneceram uma visão sobre a posição filogenética e biologia reprodutiva de várias espécies de *Beauveria*. Uma filogenia proposta por Sung et al, (2001) suporta uma única origem evolutiva de

Beauveria dentro da subfamília Cordycipitoideae da Clavicipitaceae, e que o telemorfo *C. scarabaeicola* é aninhado dentro de *Beauveria* e é irmã de *Bcaledonica* Bisset Widden. Segundo cepas isoladas de estroma de *Cordyceps*, várias espécies produzem *Beauveria anamorfa*, demonstrando claramente que algumas espécies são *Beauveria* com reprodução sexual. Estes *Cordyceps* incluem espécies de *C. bassiana* Li, Li, Huang e Fan (Li et al 2001), *C. brongniartii* Shimazu (Shimazu et al,1988), *C. staphylinidaecola* (Kobayasi & Shimazu, 1982) e *C. sobolifera* Berk (Liu et al., 2001). Juntos, a filogenética molecular e os dados culturais apóiam uma origem *Cordyceps* à linhagem *Beauveria*.

A descoberta de telemorfos *Cordyceps* associados à *Beauveria* contradiz os pressupostos anteriores que *Beauveria* é estritamente assexuada (Rehner , 2005).

3.3.2 Morfologia e Ciclo de Vida de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana é um fungo filamentosos da classe Hyphomycetes, divisão Deuteromycetes (Fungo Imperfeito ou Fungo assexuado). Assim como outros fungos entomopatogênicos, a *Beauveria bassiana* é um organismo heterotrófico que possui células eucarióticas e quitinizadas e parasitam outros insetos, graças aos seus mecanismos físicos e químicos de infecção.

Beauveria é facilmente distinguida morfológicamente, sendo formada por hifas septadas de 2,5-25 microns de diâmetro, de onde se formam conidióforos simples que raramente são agrupados, com aparência de jarros (mais largo no centro do que nas extremidades), o qual sustenta os conídios, originário de uma simpodial ou acrópeta (BARRON, 2001; CARRILLO, 2005; KOUASSI, 2001)

Sua característica mais típica é a formação de grupos de células conidiogênicas curtas e globosas ou em “flask-shaped” que produzem uma sucessão de conídios unicelulares a partir de uma raque alongada e em zig-zag (KIRK et al., 2001).

Em meios aeróbios, o fungo produz conídios esféricos (1-4 microns de diâmetro) ou ligeiramente ovais (1-3 x 1,55-5,5 microns de largura), porém em condições anaeróbias produz conídios mais ovais (2m-3 microns de diâmetro e 7 microns de comprimento), chamado blastósporos. No entanto, independentemente da morfologia, o fungo tem igual capacidade de infecção. Ambos os esporos e hifas são hialinosos que

fazem as colônias ser esbranquiçadas a olho nu (KOUASSI, 2001). No entanto, o reconhecimento e a identificação de espécies de *Beauveria* é uma problemática devido à deficiência de informação sobre suas variações morfológicas. A forma dos conídios é a única característica morfológica em *Beauveria* útil na diferenciação entre espécies e pode variar de globoso, elipsóide, cilíndrico, reniforme e vermiforme, com uma grande variedade de tamanhos (REHNER, 2005).

Devido às espécies de *Beauveria spp.* se reproduzirem através da produção de conídios, elas foram inferidas como assexuadas e foram tradicionalmente classificadas como fungos Deuteromicetos na Classe dos Hifomicetos assexuados. No entanto, com o surgimento de técnicas moleculares, foi possível agrupar essas espécies para junto de seus parentes sexuados (REHNER, 2005).

Viaud et al, (1998) relatam que há recombinação parassexual no gênero *Beauveria sp*, assim como outros, tais como *Aspergillus sp* e classes de Ascomiceto, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Este tipo de processo genético consiste de primeira instância na formação de um heterocário (uma célula com dois ou mais núcleos geneticamente diferentes), onde há fusão de dois diferentes núcleos haplóides para formar um núcleo diplóide heterozigoto. Após a recombinação mitótica, ocorre a redução da informação genética do núcleo para o nível original de haplóides. Este tipo de processo gera grande variação genética devido ao cruzamento inter- cromossomo, mas muitas vezes é limitada (JENKINS, 1990, VIAUD et al., 1998).

B. bassiana tem um modo dimórfico de crescimento. Na ausência do inseto específico, a *Beauveria* passa por um ciclo de vida vegetativa assexual que inclui germinação, crescimento filamentosos e a formação de conídio simpodial. Na presença de seu inseto hospedeiro, *Beauveria* muda para o ciclo de vida patogênico. Os conídios germinam na superfície da cutícula e as hifas germinadas penetram o tegumento do inseto diretamente. Após ter penetrado na cutícula, o fungo altera sua morfologia de crescimento para a fase leveduriforme e produz hifas e corpos que circulam na hemolinfa e proliferam por brotamento.

Após a morte do hospedeiro, o crescimento do fungo reverte para a forma típica de hifas (o estágio saprófita). A capacidade de converter para a fase leveduriforme pode ser um pré-requisito para patogenicidade.

3.3.3 Mecanismo de Ação e Agressividade

Samson (1981) considerou duas espécies de *Beauveria* que atacam com maior frequência os insetos, *B. bassiana* e *B. brongniartii*.

A patogenicidade foi demonstrada pela primeira vez por Agostino Bassi de Lodi (1835), precursor dos estudos de doenças infecciosas, demonstrando pela primeira vez que um micro-organismo pode ser responsável por doenças infecciosas em animais.

O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, assim como das condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro (ALVES, 1998). O modo de infecção de *Beauveria bassiana* é dividido em quatro fases distintas que são adesão, germinação, diferenciação e penetração (KOUASSI, 2001).

A associação entre o fungo e o inseto é caracterizada por um mecanismo de reconhecimento e compatibilidade dos conídios com as células do tegumento do inseto (VEY et al., 1982). A fixação da célula fúngica à cutícula do inseto pode envolver mecanismos específicos, receptor-ligante, e/ou inespecíficos, como as forças hidrofóbicas e eletrostáticas.

A adesão é dividida em duas fases, na primeira, o acesso passivo para a cutícula é conseguido através das forças hidrofóbicas e eletrostáticas e a segunda é caracterizada por ativar a produção de mucilagem que causará uma mudança epicular, devido à mucilagem produzida interagir quimicamente com as lectinas de membrana e gerar uma atmosfera favorável para a secreção de enzimas (KOUASSI 2001; WONG, 2003; DUPERCHY, 2003). A adesão dos conídios ao tegumento dos insetos também parece estar relacionada com a camada de microbastonetes “rodlets” de natureza lipoprotéica ou de outra constituição química (BOUCIAS et al., 1988). Esse processo depende da presença de enzimas (esterases e proteases) que ocorrem na superfície dos conídios não-germinados e que alteram a superfície do tegumento do inseto, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo (ST. LEGER et al., 1991).

Após a fase de adesão, a germinação será dependente das condições ambientais e também da fisiologia do hospedeiro (composição bioquímica da cutícula do hospedeiro), que podem promover ou inibir a germinação (ST. LEGER et al., 1989; BUTT et al., 1995; SMITH e GRULA, 1982; BUTT e BECKET, 1994). A velocidade de

germinação dos conídios é maior para os isolados mais virulentos de *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *V. lecanii* (PEKRUL e GRULA, 1979; JACKSON et al., 1985).

A penúltima etapa é caracterizada pela diferenciação da estrutura terminal para produção de apressórios, que servirá como ponto de ancoragem, suavizando a cutícula e promovendo a penetração (ST. LEGER et al., 1989). Na extremidade do tubo germinativo ocorre uma dilatação das hifas, formando uma estrutura denominada apressório, a qual ajuda na última fase, a penetração da cutícula através da atividade enzimática extracelular (quitinases, lipases, esterases e proteases) e pressão mecânica (KOUASSI, 2001; WONG, 2003; DUPERCHY, 2003). Algumas cepas produzem toxinas não-enzimáticas, como a bovericina, a beauverolides, a bassianolides e a isarolides que acentuam e aceleram o processo de infecção (ROBERTS, 1981; HAJECK e ST. LEGER, 1994).

Finalmente, há a invasão e proliferação de hifas no trato digestivo. Esta etapa ocorre após a morte do inseto, causada por danos mecânicos, desnutrição e toxicidade, e também quando as hifas secretam um antibiótico (oosporina), que ataca as bactérias e permite superar a concorrência das mesmas no trato intestinal do inseto (KOUASSI, 2001; WONG, 2003). A fase saprofítica será caracterizada pela mumificação do cadáver transformado em esclerócios, onde mais tarde irá iniciar a formação dos conídios (WEISER, 1972).

3.4 Metarhizium anisopliae

3.4.1 Classificação Taxonômica

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um deuteromiceto, pertencente à ordem Hypocreales (Ascomycota), família motosporic Clavicipitacea. *Metarhizium* é um dos gêneros 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. flavoride*, 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, b) abordaram a taxonomia e as relações de vários táxons da China que não foram incluídos por Driver et al. (2000). Sendo assim, *Metarhizium guizhouense*, *M. taií* 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 morfoespécie *Metarhizium anisopliae* tem sido investigadas 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 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*, e *Metarhizium robertsii brunneum*. *Metarhizium lepidiotae*, *Metarhizium acridum* e *Metarhizium globosum* anteriormente incluídos no complexo de espécies críticas 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. taií* Z.Q. Liang & A.Y. Liu e ligou-o a sua espécie recém-descrita anamorfo, *M. taií* ZQ Liang & A.Y. Liu. Este nível de conexão do gênero anamorfo-teleomorfo foi fundamentado 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).

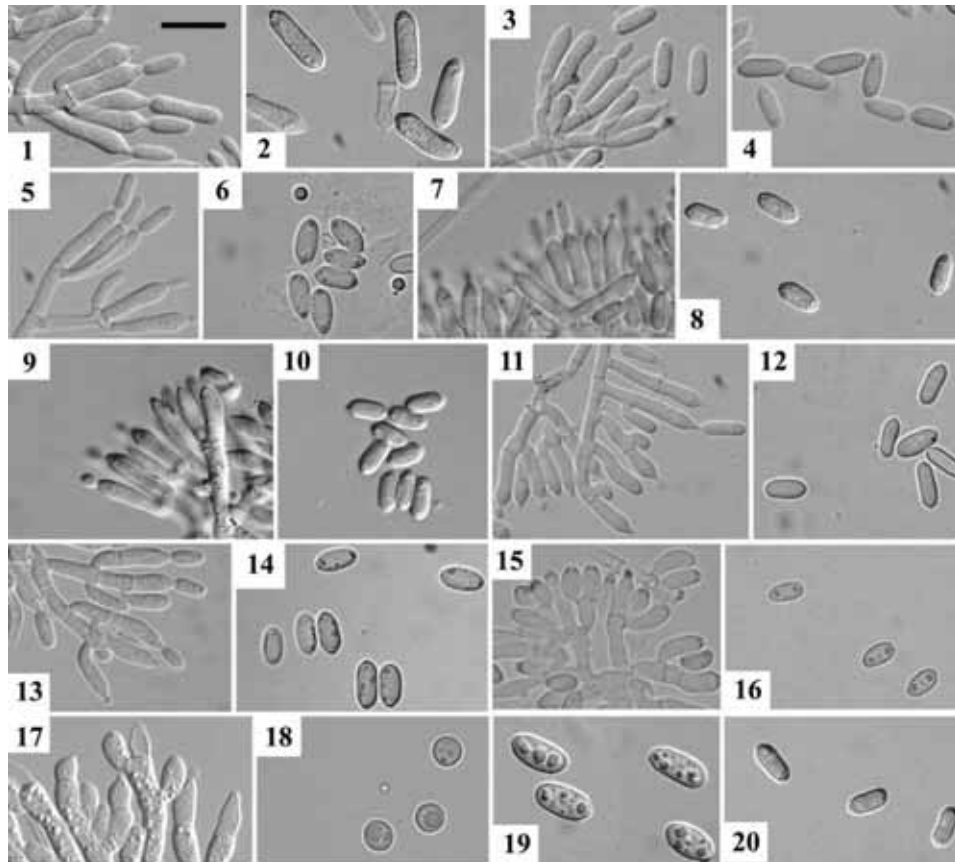


Figura 2. Conidiogênese e conídios maduros de espécies *Metarhizium*. Bar = 10 mM. 1-2. *Metarhizium majus* (ARSEF 1914). 1. Fiálides com o desenvolvimento de conídios. 2. Conídios maduros. 3-4. *M. guizhouense*. 3. Fiálides com o desenvolvimento de conídios (ARSEF 7507). 4. Conídios maduros (ARSEF 6238). 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).

3.4.2 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 assexuado, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo e a reprodução parassexuado, 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 parassexuado 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 dúvida 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 3 e 4 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).

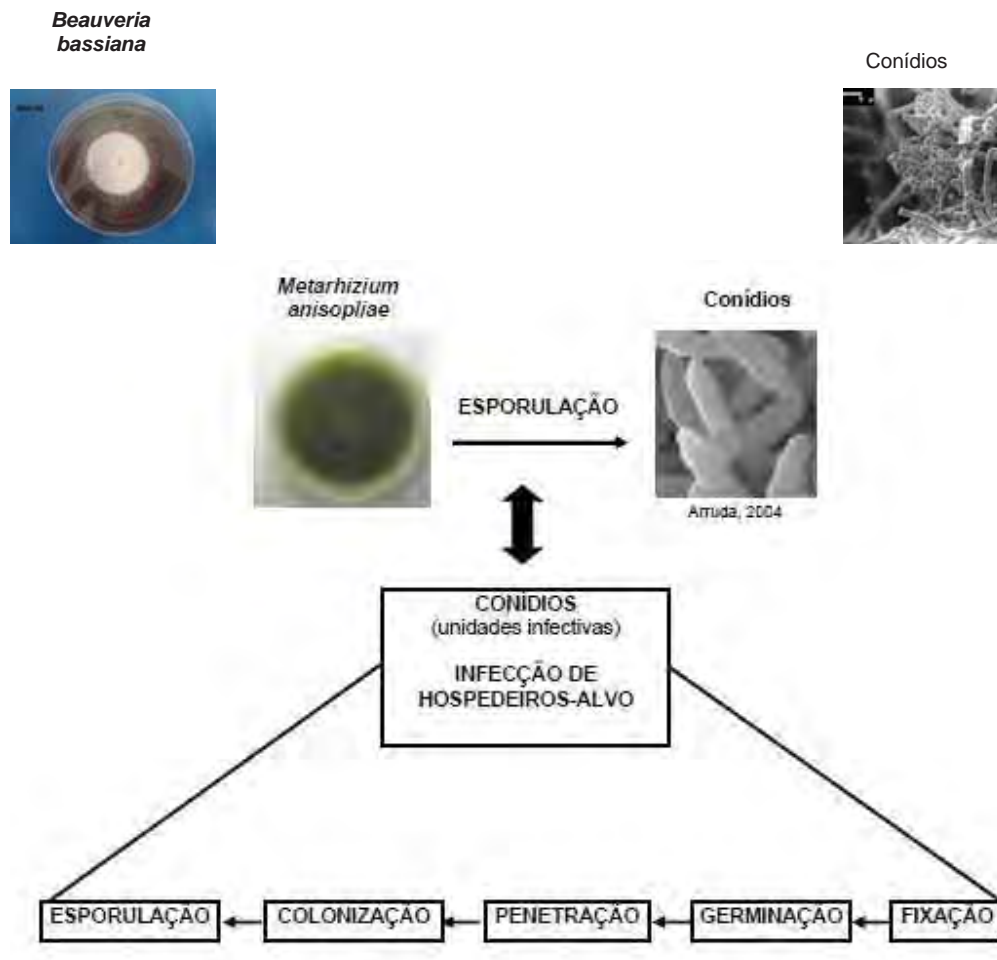


Figura 3. Ciclo biológico do fungo *Metarhizium anisopliae*



Figura 4. Ciclo de infecção de *M. anisopliae* sobre o carrapato bovino *B. microplus* (modificado de ARRUDA, 2005).

3.4.3 Mecanismo de infecção e agressividade de *Metarhizium anisopliae*

A patogenicidade de *M. anisopliae* sobre hospedeiros artrópodes depende de uma sequência de eventos de ordem mecânica e bioquímica que ocorrem de maneira simultânea a partir da deposição dos conídios sobre o tegumento do hospedeiro, seguido por germinação, penetração, colonização, exteriorização das estruturas do fungo e produção de esporos (ST LEGER et al., 1991b; ARRUDA et al., 2005).

Os conídios produzidos durante a reprodução assexuada do fungo são liberados no meio ambiente e, quando em contato com hospedeiros suscetíveis, iniciam o processo de infecção (SHAH & PELL, 2003).

Fungos patogênicos de insetos, como *Metarhizium anisopliae*, invadem seus hospedeiros diretamente através do esqueleto externo ou cutícula. Uma quantidade considerável de pesquisas tem sido realizada em enzimas de fungos que hidrolisam proteínas e quitina. Estas, por sua vez, são os principais componentes da prócutícula que compreende a maior parte da cutícula. Nesta porção encontram-se, portanto, sítios específicos para ação de proteases e quitinases. A cutícula do inseto é a primeira barreira contra o contato com inseticidas químicos ou biológicos. É formada por várias camadas, de fora para dentro: a epicutícula, a procutícula e a epiderme. A epicutícula é muito fina (0,1 – 3mm) e formada por várias camadas, sendo que cada camada possui estrutura química e propriedades diferentes (JUÁREZ et al., 2006).

M. anisopliae reconhece sinais específicos do hospedeiro, provavelmente lipídios presentes na epicutícula, e especificidade é o resultado destes sinais. No entanto, Messias & Pupin (1990) relataram que lipídios presentes na epicutícula de *Diatraea saccharalis*, entre eles os ácidos caprílico e capróico, inibem o crescimento de *M. anisopliae*.

Esporos de *Metarhizium* são deficientes em nutrientes e precisam de uma fonte externa de nutrientes para germinar. Desta maneira, na superfície do esporo ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas como proteases, esterases e N-acetilglicosidases, que auxiliam na adesão e na aquisição preliminar de nutrientes, causando modificações superficiais na superfície do hospedeiro (ST LEGER et al., 1990).

Primeiramente, ocorre uma interação hidrofóbica entre a cutícula e os conídios, seguida da secreção de uma camada de muco adesiva ao redor das estruturas fúngicas (HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1995; MENDGEN et al., 1996; BIDOCHKA et al., 1997). Tubos germinativos de *M. anisopliae* aderem à cutícula por muco amorfo secretado pela ponta das hifas durante a pré-penetração (ZACHARUK, 1970; ST LEGER et al., 1989b). A composição deste material não é conhecida, no entanto, em outros fungos compreende glicoproteínas contendo β -1, 3-glucana (STAHLMANN et al., 1992; CARZANIGA et al., 2001). Os conídios germinam sobre o inseto produzindo um tubo germinativo, que, na extremidade, se modifica formando um apressório. *M. anisopliae* pode desenvolver o apressório *in vitro* ou *in vivo* sendo influenciado pela superfície topográfica e por superfícies hidrofóbicas duras (ST. LEGER et al., 1991b; MILNER, 2000).

Alguns autores sugerem que o apressório está envolvido por uma substância mucilaginosa que se acredita ser composta principalmente de polissacarídeos e proteínas ou glicoproteínas, podendo estar envolvida no auxílio e transporte de enzimas que degradam a cutícula do fungo (ST. LEGER et al., 1989; DEAN, 1997; ARRUDA et al., 2005).

Durante a fase de penetração, há o envolvimento de enzimas e pressão mecânica na cutícula do hospedeiro. A composição complexa da cutícula dos artrópodes sugere que a penetração requer a ação sinérgica de diferentes enzimas. As enzimas produzidas durante esta etapa são principalmente: N-acetilglucosaminidases (em baixa quantidade), proteases, quitinases e lípases (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; MENDEGEN et al., 1996). Este fungo secreta uma diversificada série de proteases, particularmente subtilisinas, que são fundamentais para transpor a cutícula do inseto, colonizar e digerir tecidos, para sobreviver em nichos diversificados no ambiente durante a existência saprófita, e também podem influenciar a virulência e / ou especificidade do hospedeiro (ST LEGER et al., 1996c; SEGERS et al., 1999; FREIMOSER et al., 2003; WANG et al., 2005a, b).

As proteases são detectadas antes das enzimas quitinolíticas, em um período inferior a 24 horas após o início da formação do tubo germinativo. As quitinases provavelmente aparecem em um período mais tardio como resultado da indução pela

quitina existente na cutícula dos artrópodes, que só é exposta ao fungo após a digestão das proteínas a ela complexadas (ST LEGER et al., 1986). As quitinases e as proteases agem para solubilizar a cutícula dos hospedeiros durante a fase de penetração. Portanto, a secreção dessas enzimas é uma característica inicial importante no processo de infecção em resposta ao contato do fungo com a cutícula (ST LEGER et al., 1998b).

Outras enzimas que podem estar envolvidas no processo de infecção de *M. anisopliae* são as lípases. Apesar de haver poucos estudos publicados a respeito de lípases em fungos entomopatogênicos, foi comprovada a sua secreção por *M. anisopliae* (BEYS SILVA et al., 2005).

Entre as enzimas estudadas em *M. anisopliae*, amilase, lípase, protease e quitinase, a protease (Pr1) parece ser a mais ativa na penetração do hospedeiro (ST LEGER et al., 1992).

M. anisopliae possui a habilidade de regular a produção destas enzimas de acordo com os diferentes hospedeiros que infecta. *M. anisopliae* secreta uma grande variedade de proteases, das quais algumas estão associadas com sua virulência, já que elas facilitam a transposição da barreira da cutícula na penetração, a solubilização dos nutrientes e permite inibir peptídeos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro (FREIMOSER et al., 2005).

Após a penetração através da cutícula do hospedeiro, ocorre o desenvolvimento de blastósporos na hemocele. O meio nutritivo proporcionado pela hemolinfa leva a produção, por parte do fungo, de metabólitos secundários com ácidos orgânicos e toxinas, sendo que estas podem causar a morte do hospedeiro (BIDOCHKA et al., 1997; CLARKSON & CHARNLEY, 1996).

Fungos entomopatogênicos têm a capacidade de sintetizar toxinas que são usadas no relacionamento do ciclo do patógeno-hospedeiro. Foram encontradas toxinas dextruxinas, dimetildextruxina e protodextruxina, que são substâncias de baixa toxicidade para humanos, mas com alta atividade tóxica em insetos, ácaros e nematóides (SANDINO, 2003).

M. anisopliae produz uma família de destruxinas ciclodepsipeptídicas (Hexadepsipeptídeos compostos de um ácido α -hidroxi e cinco resíduos de aminoácidos)

denominadas (DTX) de diferentes tipos A, B, C, D e E, e outras 27 variantes, dependendo da sua composição (BIDOCHKA et al., 1997; CLARKSON & CHARNLEY, 1996; PEDRAS et al., 2002).

As destruxinas afetam várias organelas como retículo, mitocôndrias, retículo endoplasmático e a membrana nuclear, fechando células e causando disfunção do intestino, túbulos de Malpighi, hemócitos e tecido muscular dos insetos. São capazes de inibir a proliferação de células neoplásicas de mamíferos; e os efeitos supressores na superfície do antígeno viral da hepatite B da destruxina B, sugerindo ser um candidato em potencial no desenvolvimento de agentes contra a hepatite (PEDRAS et al., 2002).

Após a morte do hospedeiro, a invasão de todos os tecidos e o esgotamento de nutrientes do hospedeiro, as hifas de *M. anisopliae* se estendem para fora do cadáver, formando o micélio que cobre a superfície do tegumento, resultando na mumificação (MILNER, 2000). Em condições de temperatura ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos hidrofóbicos e de coloração verde oliva, que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos, resultando em novo ciclo de infecção (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; SHAH & PELL, 2003).

3.5 Gama de Hospedeiros

Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. e *Metarhizium anisopliae*(Metsch.) Sorok. são mundialmente conhecidos e utilizados como agentes biocontroladores de inúmeras pragas agrícolas. Essas espécies apresentam potencial de controle para diversas ordens de insetos, inclusive para pragas de lepidópteros, como *Plutella xylostella* (L.) (VANDENBERG et al., 1998), *Alabama argilácea* (CÉSAR FILHO, 2000) e *Diatraea saccharalis* Fabr. (ALVES et al., 1984), como também do gênero *Castnia* que são suscetíveis a *B. bassiana* e *M. anisopliae*, a exemplo da broca do talo do abacaxizeiro *Castnia icarus* (Cramer) (Silva & Veiga 1998) e principalmente apresentam potencial para o controle microbiano de *C. licus* (MARQUES et al., 2001).

O fungo *Beauveria bassiana* possui grande atividade entomopatogênica em vários tipos de insetos em todo o mundo, incluindo ordens de Coleoptera, Lepidótera, Homoptera e Arthropoda (ALCÁZAR et al., 1999). Encontramos estirpes com virulência

sobre importantes pragas, tanto para a agricultura e os seres humanos. Na agricultura, tem sido utilizado para o combate da barata da batata do Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), cupins e formigas (*Acromyrmex sp*, *Atta sp*), broca do milho (*Ostrinia nubilalis*), lagarta do pinheiro (*Dendrolimus spp*), grilos verdes (*Nephotettix spp*) e mariposas (*Laspeyresia pomonella*) (Wong, 2003). Também em pragas do algodão como *Anthonomus grandis*, *Cosmopolites sordidus*, da banana *Phyllophaga sp* e batata *Ancognatha sp*, ornamentais como *Compsus sp*, *Cosmopolites sordidus* e abacaxi *Pseudococcus sp*, palma *Loxotoma elegantes*, ácaros *Thrips sp* em geral e *Corytucha sp* em vegetais e frutas, entre outros (EDAFON, 2005). *M. anisopliae* infecta mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens, incluindo pragas importantes (ALVES, 1998). Alguns de seus hospedeiros são pragas na agricultura, como a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), a cigarrinha-das-pastagens (*Deois sp* e *Zulia sp*), a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), a formiga saúva (*Atta sexdens*), os térmitas subterrâneos (*Isoptera : Rhinotermitidae*). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (KAAYA et al., 1996; ZHIOUA et al., 1997; FRAZZON et al., 2000).

No campo da saúde humana, fungos entomopatogênicos tem sido alvo de grande interesse no controle de insetos de importância médica, como mosquitos (SCHOLTE et al. 2005, KANZOK e LORENA 2006). Estirpes de *Beauveria bassiana* podem atacar a mosca tsé-tsé (*Glossina morsitans*) mosquito Sandy (*Phlebotomus sp*) que transmite Leishmania, os insetos do gênero *Triatoma* e *Rhodnius*, vetores da doença de Chagas, e *Anopheles stephensi*, que transmite a malária (WONG, 2003; BLANFORD, 2005). *Metarhizium anisopliae* IP 46 foi efetivo contra ovos (LUZ et al., 2007, ALBERNAZ et al., 2009), larvas e adultos de *Aedes aegypti* em condições de laboratório (SCHOLTE et al., 2004).

3.6 Variabilidade Genética dos Fungos Entomopatogênicos

A variabilidade genética é um dos mecanismos de evolução utilizados pelos seres vivos e pode ser alcançada pelos fungos através de mutação ou recombinação gênica. A mutação é o principal mecanismo de variabilidade em fungos (BORBA et al., 2007). A variabilidade é uma das características fundamentais dos seres vivos, pois é

ela que permite a distinção de indivíduos dentro das espécies e foi ela que possibilitou o surgimento de novas espécies em resposta às modificações do ambiente durante o processo evolutivo. Em espécies que apresentam algum mecanismo de recombinação, inclusive naquelas que se reproduzem assexuadamente, existe variabilidade (AZEVEDO, 1998).

Alguns trabalhos consideráveis tem sido feito sobre a diversidade genética de *Beauveria* e *Metarhizium* usando diferentes e tradicionalmente utilizadas, técnicas moleculares de classificação dentro de uma determinada região geográfica (ENKERLI et al., 2005;. BIDOCHKA et al., 2001) que revelam variabilidade genética significativa. Inglis et al. (2008) analisou a abundância e diversidade genética de *Metarhizium* em dois diferentes localizações geográficas do Canadá, mas a variabilidade genética observada foi mínima devido a alguns fatores incertos. Alguns trabalhos sugerem que a estrutura genética de populações de *M. anisopliae* pode ser bastante complexa e pode variar entre as regiões e habitats e que genótipos específicos podem ocupar determinados nichos ecológicos (BIDOCHKA et al., 2001; INGLIS et al., 2008).

Estudos têm predominantemente focado na genotipagem e a correlação de genótipos de fungos para hospedeiros e geografia em escala global ou escala continental (PONTE et al., 1997;. FEGAN et al., 1993;. FUNGARO et al., 1996; ST. LEGER et al., 1992; VELA'SQUEZ et al., 2007). Freed et al. (2010) em um estudo para detectar a prevalência e variabilidade genética de *M. anisopliae var. anisopliae* em países Asiáticos (China, Laos, Cingapura e Coréia do Sul) e um país europeu (Holanda), identificaram a presença do fungo entomopatogênico dispersos em solos agrícolas e florestais em toda a China, principalmente nas regiões sul e sudoeste. Também identificaram baixa variabilidade genética entre os isolados de diferentes localidades dentro da China e países vizinhos. A teoria da biogeografia sugere que a riqueza local de espécies é afetada pelos eventos passados e as condições envolvidas (MARTINY et al., 2006). Variabilidade genética mínima existente em populações de fungos entomopatogênicos pertencentes a localidades diferentes pode ser resultado da imigração para as regiões vizinhas ou os isolados apresentarem evolução a partir da estirpe ancestral comum (FREED et al., 2010).

Poucos estudos têm investigado a diversidade regional em regiões geograficamente de áreas uniformes e contínuas ou diversidade local em campos individuais ou habitats (MEYLING e ELLENBERG, 2007). Oulevey et al. (2009) detectaram grande diversidade genética em isolados de *M. anisopliae* de uma mesma região, bem como, em escala de campo. O mesmo foi observado por Carneiro et al. (2002) entre isolados de *B. bassiana*. Na maioria dos casos a única fonte de variação genética desses microrganismos é a mutação. Apesar de seu modo de reprodução assexual, a espécie *B. bassiana* pode apresentar uma considerável variabilidade genética devido a sua ubiqüidade, ampla distribuição geográfica e larga faixa de hospedeiros (CARNEIRO et al., 2002).

A fim de reforçar a eficácia dos programas de controle biológico e selecionando um genótipo eficiente para o controle de insetos pragas é necessário entender a filogenia / população genética do ecossistema particular (INGLIS et al.2008).

3.7 Especificidade por Hospedeiros

O estudo das características básicas da relação entre o microrganismo e o seu respectivo hospedeiro tem permitido um melhor entendimento do processo de patogenicidade e de suas características específicas. A grande variabilidade genética que apresenta *M. anisopliae* e *B. bassiana*, resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência à luz ultravioleta (ALVES, 1998; ARRUDA, 2005). Linhagens patogênicas desses dois fungos para uma espécie particular de hospedeiro, podem não apresentar as mesmas características de patogenicidade para outras espécies de artrópodes (HUXHAM et al., 1989).

Para que as hifas dos fungos atravessem a cutícula dos artrópodes, a especificidade e a resposta do hospedeiro parecem críticos para a sequência de eventos que culmina em uma infecção eficiente. Sugere-se que várias classes de genes de patogenicidade estejam envolvidas nesse processo (FREIMOSER et al., 2003; DUTRA et al., 2004).

Wang et al. (2002), mostraram que mutantes espontâneos estáveis de *M. anisopliae* deficientes para o gene *pr1a* e *pr1b* são capazes de infectar o inseto *Galleria mellonella*. A infecção ocorreu em níveis similares aqueles da linhagem selvagem, mas

com uma redução na patogenicidade para outro inseto, *Tenebrio molitor* (WANG et al., 2002). Além disso, uma linhagem transformada de *M. anisopliae* superexpressando a enzima pr1a não apresentou nenhuma alteração aparente na infecção do carrapato bovino, porém apresentou maior eficiência na morte de larvas de *Anticarsia gemmatilis* e da lagarta- do- cartucho, *Spodoptera frugiperda* (FRANCESCHINI, 2005). Gillespie et al. (1998), observou que a contribuição de Pr1 na degradação não foi a mesma para cutícula de *M. sexta* e do gafanhoto *S. gregaria*. Estes resultados sugerem uma possível participação de Pr1 na especificidade ao hospedeiro. Diferentes isoformas das proteases estão relacionadas com a patogenicidade, aumento da adaptabilidade em diferentes ambientes e especificidade para o hospedeiro, podendo ocorrer também com genes de outras hidrolases envolvidas nesse processo. Atividades lipolíticas podem direcionar também a especificidade por determinados hospedeiros e facilitar a degradação de diferentes compostos lipídicos (STHER et al., 2004).

Metarhizium anisopliae é encontrado atacando muitas espécies de insetos, sendo que, alguns isolados, possuem considerável especialização em relação ao hospedeiro. Muitas diferenças na patogenicidade indicam que naturalmente ocorre variação genética. Outros fatores relacionados a patogenicidade incluem a dimensão dos conídios, taxa de crescimento do fungo e atividade enzimática (ST LEGER et al., 1992). A especificidade dos fungos entomopatogênicos varia consideravelmente de espécie para espécie: alguns têm largo espectro de hospedeiros; outros são restritos a uma ou poucas espécies de insetos (POINAR & THOMAS, 1984 citados por FIGUEIREDO, 1997). Tamai et al. (2002) encontraram patogenicidade de *A. aleyrodis* a *T. urticae* reduzida. Pode ser explicada, em parte, pelo fato desta espécie de fungo possuir seu espectro hospedeiro composto predominantemente por cochonilhas, pulgões e moscas brancas (Hemiptera: Sternorrhyncha) (ALVES, 1998; SAMSON et al., 1988).

A diferença de mortalidade dos adultos causada pelo entomopatógeno é observada com frequência em ensaios de seleção, podendo estar associada com a variabilidade genética existente na espécie *B. bassiana*, com a baixa virulência do isolado e principalmente com a especificidade e tolerância ao hospedeiro (ALVES, 1998). Barci et al. (2009), em um estudo de seleção de isolados de *B. bassiana* para o

controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) testou vários isolados, porém os isolados IBCB01, IBCB17, IBCB74 e IBCB66 são os que apresentam maior potencial para utilização a campo, tendo em vista o controle de *R. (B.) microplus*. Por outro lado, Almeida et al. (2009) utilizando estes mesmos isolados para controle da “broca da bananeira” *Cosmopolites sordidus* não obtiveram sucesso, pois a mortalidade confirmada dos insetos causada por esses isolados não atingiu 50%. Fernandes et al. (2003), que isolaram três estirpes – Bb28, Bb29 e Bb30 de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* coletadas a campo em testes realizados em condições de laboratório, conduzidos com os isolados supramencionados, permitiram verificar altas porcentagens de mortalidade de larvas tratadas em comparação ao grupo controle. Estirpes indígenas associadas ao hospedeiro pode oferecer um controle mais efetivo do que as cepas provenientes de outras espécies de insetos, pois a primeira pode ser melhor adaptada para o hospedeiro e o ambiente de hospedeiro.

3.8 Variabilidade Patogênica

Embora, em uma mesma espécie de fungo, os indivíduos sejam morfológicamente idênticos, eles apresentam características próprias, apresentando grande variabilidade patogênica mesmo sobre uma determinada espécie de um hospedeiro. Vários trabalhos descrevem diferenças quanto a patogenicidade entre isolados de *B. bassiana* (HASTUTI et al., 1999) e *M. anisopliae* (FRAZZON et al., 2000) sobre diferentes artrópodes. Estudos desenvolvidos com diversas estirpes de fungos mostraram que a variabilidade genética dos isolados, principalmente quanto a parâmetros moleculares e de patogenicidade, determinam diferenças no grau de virulência do patógeno, interferindo, dessa maneira, nos percentuais de eficiência de controle de insetos e ácaros (ALMEIDA et al., 1997; TAMAI et al., 2002; FERNANDES et al., 2006).

Fernandes et al. (2006) estudaram a patogenicidade de isolados de *B. bassiana* para larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus*. Analisando-se os percentuais de eficiência dos isolados de *B. bassiana* testados para larvas de *R. (B.) microplus*, pode-se verificar que, dos trinta isolados avaliados, sete apresentaram índices entre 90 e 99%. Relacionaram o efeito deletério produzido nesses instares à variabilidade genética

das estirpes e constataram que alguns isolados, apesar de patogênicos, não são eficazes, pois, mesmo quando utilizados em altas concentrações, não produziram índices de mortalidade satisfatórios para este inseto. ACEVEDO et al. (2007), estudando as interações entre diversos entomopatógenos e a broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis*, relataram variações nos índices de mortalidade e apontam um isolado como altamente promissor, pois esse foi capaz de provocar a mortalidade de 100% das lagartas em seu tratamento. Estas mesmas variações também puderam ser observadas em outros grupos de insetos. CINTRA et al. (2003) observaram mortalidades confirmadas entre 10 e 70% para ninfas da cigarra-de-café *Fidicina sp.* XAVIER et al. (2005), em teste de patogenicidade de alguns isolados ao percevejo castanho, também observaram variações nos valores das mortalidades confirmadas estando entre 10 e 78%. LOUREIRO et al. (2005b), selecionando isolados de *M. anisopliae* à cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata*, relatam que variações entre 10 a 90% também ocorreram em seus experimentos.

Segundo CAMPOS et al. (2011) a distinta variabilidade intraespecífica e intragênica da virulência de *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra ninfas de *Periplaneta americana* obtida em seus estudos, enfatiza a importância de um “screening” de amplo espectro com diferentes espécies e gêneros de fungos, especialmente se há somente poucas informações sobre a especificidade e virulência de fungos entomopatogênicos ou isolados contra uma espécie alvo.

3.9 Técnicas de Caracterização Molecular dos fungos entomopatogênicos

A caracterização morfológica, fisiológica e genética de isolados de fungos entomopatogênicos permite encontrar isolados com maior potencial para controlar populações de *Diatraea saccharalis*. 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).

A partir da década de 70, o surgimento de numerosas técnicas moleculares permitiu novas oportunidades para o avanço de estudos nas áreas da taxonomia,

filogenia e genética de população de *Beauveria*. Durante as décadas de 80 e 90, numerosos estudos foram publicados utilizando-se da quimiotaxonomia, bioquímica e técnicas baseadas na análise direta do DNA para caracterizar modelos de variação genética e relacioná-los ao gênero *Beauveria* (REHNER, 2005).

Técnicas baseadas em análise direta do DNA em sistemas baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) também têm contribuído para o conhecimento de variação genética nas populações de *B. bassiana* e grande heterogeneidade intra-específica tem sido observada por Mauer et al. (1997), Berreta et al. (1998), Bidochka et al. (2002) e por Wang et al. (2003).

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, 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., 2011).

Há várias técnicas disponíveis, cada uma utilizando uma estratégia particular para detectar polimorfismos de DNA. O método generalizado de random amplified polymorphic DNA (RAPD) 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 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, 2006).

Uma série de métodos inespecíficos baseados no DNA tem sido usada em estudos publicados de fungos, em especial de *Beauveria* (GLARE, 2004). No entanto, o problema com esses métodos é que eles fornecem poucas informações filogenéticas dos fungos e esses não podem ser usados para comparar os dados explicitamente entre os estudos.

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 ITS (espaçador transcrito interno), 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 devem ser utilizadas para cada região alvo, para aumentar a variabilidade (MEYLING, 2008).

Mais variáveis podem ser obtidas com o método de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ou Polimorfismo por Comprimento de Fragmento Amplificado). 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. O tamanho 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).

A técnica ISSR (“Inter-simple Sequence Repeat”) é similar a RAPD, mas utiliza iniciadores mais longos, com 15-20 nucleotídeos e durante a PCR é utilizada maior temperatura na etapa de anelamento (47-53 °C) do que comparado com a utilizada na RAPD (35-39 °C), o que a torna mais reproduzível (DE MURO et al., 2005). Essa técnica tem sido usada com sucesso para verificar variabilidade genética em *B. bassiana*, no Oriente Médio, China e Coleções de Culturas do Japão (DE MURO et al., 2005; WANG et al., 2005; Takatsuka, 2007). Estrada (2006) utilizou marcadores ISSR-PCR para identificar e analisar a diversidade genética de onze isolados de *Beauveria bassiana* com diferentes origens geográficas e obtiveram perto de 80% de polimorfismo com estes marcadores. Recentemente Li (2010), em um estudo, utilizou ISSR-PCR para rastrear a origem molecular da doença da muscardine branca em bichos-da-seda causada por *B.bassiana*, muito incomum, no leste da China.

Outro marcador molecular amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies é o DNA ribossomal n(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 separada 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), são regiões que contém muito mais variabilidade e, portanto, mais informações do que ITS. Estas regiões estão começando a ser empregadas em estudos de *Beauveria spp* (GLARE et al., 2008; REAY et al., 2008).

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 USDA-ARS, em Beltsville, MD, EUA. O esboço da plataforma foi apresentada 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).

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 PCR para a detecção específica e quantificação de *Pandora neoaphidis* no ambiente, Schwarzenbach et al. (2009) aplicaram seis sequências de repetição simples (SSR) 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 *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* (DESTEFANO 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).

A caracterização de microssatélites tem sido usada em vários estudos como marcadores moleculares para caracterização interespecífica e intra-específica devido ao seu alto grau de polimorfismo ou variação na diferenciação alélica (ZANE et al., 2002;. GOLDSTEIN et al.,1995).

Há sequências de primers disponíveis para *B.brongniartii* (ENKERLI et al.,2001), *B.bassiana* (REHNER & BUCKLEY, 2003) e *M. anisopliae* (ENKERLI et al.,2005).

Para *B. bassiana* também vêm sendo empregada uma série de seqüências SSR para estudos de caracterização, as quais foram desenvolvidas por Rehner e Buckley (2003). Essa técnica revelou não só diferenças entre as populações daquele fungo em todo o mundo, mas mesmo as diferenças entre isolados altamente relacionados com nível geográfico e hospedeiros (MCGUIRE et al., 2005.; ENKERLI et al., 2001, REHNER & BUCKLEY, 2003, WANG et al., 2003). Apesar dessas técnicas, a genética de *Beauveria* não está ainda bem caracterizada (REHNER, 2005).

Para avaliar *Beauveria bassiana* e *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. Esses dados não só complementaríamos informações biológicas fundamentais, mas também contribuiríamos em fazer cumprir as exigências para o registro de produtos biológicos (WANG et al., 2003). 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).

Considerando que as linhagens presentes nos mais variados ambientes sofrem diferentes pressões seletivas, estando sujeitas a diferentes tipos de modificações genéticas, é natural que as cepas acabem por apresentar diferentes perfis fisiológicos e também na sua capacidade de infecção. Com base nessas considerações, o presente trabalho buscou avaliar o potencial de infecção de *D. saccharalis* por linhagens de *M. anisophae* e *B. bassiana* isolados de diferentes amostras ambientais, assim como, estudar a variabilidade genética entre as linhagens por técnica de sequenciamento de regiões microssatélites.

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Beauveria* sp. E
Metarhizium sp.

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 solo caracteriza-se como um grande reservatório natural de fungos entomopatogênicos e em seu ambiente natural é o ambiente mais afetado por estas práticas. Desta maneira, a coleta, o isolamento e a preservação em coleções de culturas de fungos patogênicos de insetos de importância agrícola é uma prática de fundamental importância para a preservação da biodiversidade de entomopatógenos.

Os procedimentos normais para a estruturação de um banco de entomopatógenos são: coleta do material (insetos moribundos ou mortos, solo, partes da planta hospedeira e água); isolamento do micro-organismo (técnicas específicas para cada espécie); identificação e conservação do patógeno (desde a conservação do inseto morto ou em tubos de cultura até a liofilização) por um longo período. Além disso, o banco de patógenos necessita de manutenção constante, para que se possa fazer uma avaliação da viabilidade dos microrganismos armazenados a cada ano, com diferentes técnicas e introdução de novos patógenos, assim como a organização e informatização dos dados a respeito da coleção (ALVES, 1998).

Além de sua importância como fonte de variabilidade genética para seleção de patógenos ou de isolados de patógenos de insetos, o banco de micro-organismo entomopatogênicos é também uma fonte de recursos genéticos utilizados em programas de biotecnologia, melhoramento genético e em outras áreas do conhecimento, proporcionando aos Institutos, Universidades, Empresas e a outros que trabalham com microrganismos entomopatogênicos material genético a ser aplicado e conservado à longo prazo, devido a sua importância como agente de controle de pragas e até, se for o caso, para uma produção comercial do entomopatógeno (EMBRAPACENARGEN, 1996).

Mais de 20 gêneros de fungos já foram constatados atacando insetos de importância agrícola, seja na forma enzoótica e/ou epizoótica (ALVES, 1992). O fungo

Metarhizium anisopliae é amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado facilmente nos solos, onde sobrevive por longos períodos (ALVES, 1998). As espécies de fungos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* podem ser isoladas do solo e insetos e *B. bassiana* também pode ser isolada de partes de planta e do ar (MEYLING e EILENBERG, 2007). Todos estes compartimentos ambientais devem ser considerados quando sistemas de coleta são planejados, pois se coletar apenas as pragas específicas que são infectadas, a coleção não vai fornecer informações de como os patógenos interagem com o ambiente.

Os fungos possuem uma ampla variedade genética e, portanto, em todo o programa de controle microbiano de pragas com esses agentes, faz-se necessária a seleção de isolados para a determinação da patogenicidade, da virulência e da produção de conídios. É importante salientar que um isolado de um determinado fungo significa que este foi coletado e isolado de um inseto ou de um solo de uma região geográfica diferente das de outros isolados da mesma espécie.

Com esse propósito foram coletados insetos mortos e moribundos que apresentaram a extrusão do patógeno ou com características da doença em diversas culturas, além de coletas de solo.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. de amostras de solo, insetos e produtos comerciais.

Visando a construção de uma micoteca com isolados de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp., foram realizadas visitas a campos de diferentes culturas e diferentes regiões, acompanhadas de coletas de amostras de insetos parasitados por *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. e de solos com e sem cultivos. Foram coletadas 104 amostras de solos e 20 amostras de insetos parasitados. Também foram obtidos isolados de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. de diversos institutos e isolados comercializados por diferentes empresas. Desta forma, representantes de diferentes regiões e hospedeiros foram isolados das amostras coletadas, permitindo um elevado grau de seleção e obtenção de uma população representativa da diversidade das espécies de *Beauveria* e *Metarhizium*.

2.2 Obtenção de isolados fúngicos a partir de insetos

Os insetos coletados foram armazenados em recipientes plásticos estéreis, identificados e levados para o laboratório. Foram anotados dados do ambiente assim como a coloração que o inseto apresentava, uma vez que, segundo Batista Filho et al. (1988), esta, em alguns casos, pode fornecer subsídios para a identificação do patógeno.

A partir de insetos com sintomas e sinais de parasitismo por *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp., foram obtidos isolados por meio da técnica de semeadura direta de esporos em meio de cultura. Com o auxílio de uma pinça de ponta fina, um pedaço do tegumento do inseto foi retirado e colocado em tubo de ensaio com 10mL de água destilada esterilizada. O tubo foi agitado em vórtex para homogeneização da suspensão de esporos e, a partir desta suspensão, 10µL foram espalhados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, pH 6,8 contendo 200 g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar para cada 1000mL de água destilada) com o auxílio de uma alça de Drigalski. Além da técnica de semeadura em superfície, foi utilizada a técnica de esgotamento por meio de estrias superficiais, onde a amostra é semeada na superfície do meio solidificado com uma alça de semeadura objetivando esgotar a população e obter colônias monospóricas. As placas semeadas foram incubadas a 25°C ± 2°C por sete dias, até o desenvolvimento e esporulação do fungo.

2.3 Obtenção de isolados fúngicos a partir de amostras de solo

As amostras de solo foram também armazenadas em recipientes plásticos estéreis. Para o isolamento de fungos entomopatogênicos a partir do solo seguiu-se a metodologia proposta por Leite et al. (2003), onde as amostras do solo foram homogeneizadas e, então, subamostradas retirando-se de cada uma delas 1 g de material. As subamostras foram acrescidas a um volume de água na proporção de 1:100 (solo/água). Após agitação, foram feitas diluições sucessivas, totalizando cem vezes para, em seguida, ser retirado 1 mL da última diluição e espalhados em meio de cultura semi-seletivo(aveia-Dodine) (Chase et al. 1986) [20g aveia; 1L água destilada; autoclavar e filtrar; completar o volume para 1L e adicionar 20g ágar; 550mg dodine

(acetato de N-dodecilguanidina); 5mg tetraciclina e 10mg cristal violeta] para o isolamento de *Beauveria* sp.

Para o isolamento de *Metarhizium* sp., foi utilizado o meio de cultura semi-seletivo de Veen & Ferron (1966) [500mg de clorafenicol, 35g de ágar, 6g de glucose, 10g de peptona, 15g de bÍlis bovina e 10mg de ciclohemidina; autoclavar e completar o volume para 1L de água destilada e adicionar 200mg de cicloheximida, 200mg de clorafenicol, 100mg de tetraciclina e 80mg de eritrocina].

Os fungos foram repicados em BDA até que se obtivessem culturas puras dos micro-organismos. Culturas puras dos fungos foram submetidas a análises microscópicas efetuando-se a identificação e classificação, com auxílio de chaves taxonômicas (ALVES, 1998; ALVES et al., 1998; ALVES; LOPES, 2008). Após a constatação do entomopatÓgeno, cada isolado foi multiplicado por meio de semeadura com alça de platina e posterior espalhamento em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. As placas foram transferidas para B.O.D. e incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por sete dias, até o desenvolvimento e esporulação do fungo.

Posteriormente, os conÍdios foram retirados por meio de raspagem com alça metálica e armazenados em tubos plÁsticos do tipo Eppendorf e mantidos em freezer a -20°C .

Também as culturas monospÓricas obtidas foram inoculadas em tubos de cultura contendo arroz parboilizado (autoclavado a 120°C por 1h) e estes incubados a 25°C por 15 dias e armazenados a -20°C . Para confeccionar a coleção foram armazenados dois tubos de cada isolado fÚngico em arroz e os esporos (pÓ) em frascos de ampicilina. Para o armazenamento, parte da umidade do fungo foi retirada com o uso de sílica gel em dessecador (ambos autoclavados). A cada doze meses, as culturas foram reativadas em *D. saccharalis* e novamente armazenadas em arroz e esporos puros.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Coleta e isolamento de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp.

Foram fornecidas 19 amostras de fungos entomopatÓgenicos de Empresas produtoras de bioinseticidas. Destas, foram obtidos quatro isolados de *Beauveria* sp. e

15 de *Metarhizium* sp. (tabelas 2 e 6). Também foram obtidos 43 isolados fúngicos de Institutos de Pesquisa, sendo 14 de *Beauveria* sp. e 29 de *Metarhizium* sp. coletados entre os anos de 1986 a 2010 os quais são apresentados nas tabelas 3 e 7.

Neste trabalho, as coletas de amostras de solo resultaram nos isolados apresentados nas tabelas 4 e 8. Foram realizadas 104 coletas de solos (Tabela 1) de culturas agrícolas (cana-de-açúcar, feijão e milho) no período de 2007 a 2009, em regiões dos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás das quais foram obtidos 62 isolados de fungos filamentosos. Esses fungos, ao serem submetidos aos testes de identificação morfológica, 39 corresponderam ao gênero *Beauveria* (Tabela 4) e 23 corresponderam ao gênero *Metarhizium* (Tabela 8).

Os insetos *D. saccharalis*, *Sphenophorus Levis* e *Thelosia camina*, aparentemente parasitados por fungos, foram coletados na zona rural de Lucélia - SP, Colombo - PR e Ribeirão Preto - SP. Dessas amostras, isolou-se 14 fungos (Tabela 5) dos quais os 14 foram identificados, morfologicamente como *Beauveria* sp. e nenhum isolado de *Metarhizium* sp. foi encontrado.

Igualmente às amostras de solos, a proporção de *Beauveria* sp. nessas amostras (70%) foi maior e predominante do que a de *Metarhizium* sp. (0%) conforme observado na figura 3.

Tabela 1 - Relação dos isolados de *Beauveria* sp. e *Metathizium* sp. obtidos de coletas de solos em culturas agrícolas e insetos de diferentes regiões.

AMOSTRAS	ISOLADOS OBTIDOS
104 amostras de solo	41 isolados de <i>Beauveria</i> sp. 24 isolados de <i>Metarhizium</i> sp.
20 amostras de insetos	14 isolados de <i>Beauveria</i> sp. 0 isolados de <i>Metarhizium</i> sp.

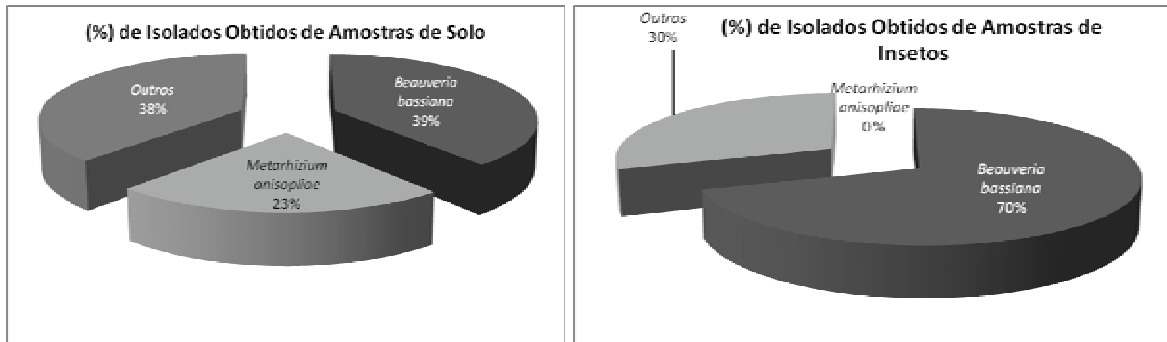


Figura 5. Percentual dos isolados de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. obtidos das amostras coletadas.

Tabela 2 - Relação dos isolados de *Beauveria* sp. obtidos de Empresas.

ISOLADOS COMERCIAIS						
DATA DE COLETA	CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	ANO DE COLETA	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	LONGITUDE/LATITUDE
02/abr	B 1	COMERCIAL 1	2008	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
02/abr	B 2	COMERCIAL 2	2008	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
02/abr	B 3	COMERCIAL 3	2008	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
04/abr	B 6	COMERCIAL 4	2008	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido

Tabela 3 - Relação dos isolados de *Beauveria* sp. obtidos de Instituição de Pesquisa.

ISOLADOS DE INSTITUTOS DE PESQUISA						
DATA DE COLETA	CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	ANO DE COLETA	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	LONGITUDE/LATITUDE
23/mai	B 20	UFRJ- Bb46	1999	Acari: Ixodidae	Paracambi- RJ	43W 42' 33"/ 22S 36' 39"
23/mai	B 21	UFRJ- Bb02	1999	Acari: Ixodidae	Paracambi- RJ	43W 42' 33"/ 22S 36' 39"
23/mai	B 22	UFRJ- LCM 01	2002	Acari: Ixodidae	Seropédica- RJ	43W 42' 27"/ 22S 44' 38"
23/mai	B 23	UFRJ- Bb 38	1999	<i>Carrapato Boophilus microplus</i>	Paracambi- RJ	43W 42' 33"/ 22S 36' 39"
10/jun	B 28	IBCB 215- INSTITUTO BIOLÓGICO	1999	Solo- Canaviais	Ribeirão Preto- SP	47W 48' 37"/ 21S 10' 39"
10/jun	B 29	IBCB 278- INSTITUTO BIOLÓGICO	2000	Solo- Canaviais	Ribeirão Preto- SP	47W 48' 37"/ 21S 10' 39"
10/jun	B 30	IBCB 279- INSTITUTO BIOLÓGICO	2000	Solo- Canaviais	Ribeirão Preto- SP	47W 48' 37"/ 21S 10' 39"
10/jun	B 31	IBCB 281- INSTITUTO BIOLÓGICO	2000	Solo- Canaviais	Ribeirão Preto- SP	47W 48' 37"/ 21S 10' 39"
10/jun	B 32	IBCB 300- INSTITUTO BIOLÓGICO	2000	Solo- Canaviais	Ribeirão Preto- SP	47W 48' 37"/ 21S 10' 39"
10/jun	B 33	IBCB 302- INSTITUTO BIOLÓGICO	2000	Solo- Canaviais	Ribeirão Preto- SP	47W 48' 37"/ 21S 10' 39"
10/jun	B 34	IBCB 597- INSTITUTO BIOLÓGICO	2007	Solo- Canaviais	Assis- SP	50W 24' 44"/ 22S 39' 43"
10/jun	B 35	IBCB 598- INSTITUTO BIOLÓGICO	2007	Solo- Canaviais	Assis- SP	50W 24' 44"/ 22S 39' 43"
10/jun	B 36	IBCB 600- INSTITUTO BIOLÓGICO	2007	Solo- Canaviais	Echaporã- SP	50W 12' 02"/ 22S 25' 46"
40553	B 73	ESALQ 447	1986	<i>Solenopsis invicta</i> (Hemiptera: Formicidae)	Cuiabá- MT	56W 05' 48"/ 15S 35' 47"

Tabela 4 - Relação dos isolados de *Beauveria* sp. obtidos de coletas de solos agrícolas.

ISOLADOS DE BEAUVERIA OBTIDOS DAS AMOSTRAS DE SOLO						
DATA DE COLETA	CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	ANO DE COLETA	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	LONGITUDE/LATITUDE
20/nov	B 4	VISTA ALEGRE- SP	2008	Solo- Milho	Vista Alegre- SP	50W 39' 00"/ 22S 10' 01"
04/abr	B 5	USINA MANDÚ	2008	Solo- Canaviais	Guaíra- SP	48W 17' 59"/20S 19' 01"
13/nov	B 13	BARBOSA- SP	2008	Solo- Canaviais	Barbosa- SP	49W 56' 56"/ 21S 15' 60"
18/nov	B 17	MARACAJÚ- MS	2008	Solo- Milho	Maracajú- MS	55W 10' 05"/ 21S 36' 53"
18/nov	B 18	MARACAJÚ- MS	2008	Solo- Milho	Maracajú- MS	55W 10' 05"/ 21S 36' 53"
18/nov	B 19	MARACAJÚ- MS	2008	Solo- Milho	Maracajú- MS	55W 10' 05"/ 21S 36' 53"
16/nov	B 38	USINA SÃO FERNANDO- MS	2008	Solo- Canaviais	Dourados- MS	54W 48' 20"/ 22S 13' 17"
20/out	B 39	BIURITI ALEGRE- GO	2008	Solo- Canaviais	Buriti Alegre- GO	49W 02' 25"/ 18S 08' 24"
20/out	B 40	BIURITI ALEGRE- GO	2008	Solo- Canaviais	Buriti Alegre- GO	49W 02' 25"/ 18S 08' 24"
18/jul	B 41	USINA CERRADINHO	2008	Solo- Canaviais	Catiguá- SP	49W 03' 30"/ 21S 02' 58"
18/jul	B 42	USINA CERRADINHO	2008	Solo- Canaviais	Catiguá- SP	49W 03' 30"/ 21S 02' 58"
20/out	B 43	MORRINHO- GO	2008	Solo- Canaviais	Morrinhos- GO	49W 05' 58"/ 17S 43' 53"
20/out	B 44	MORRINHO- GO	2008	Solo- Canaviais	Morrinhos- GO	49W 05' 58"/ 17S 43' 53"
20/out	B 45	MORRINHO- GO	2008	Solo- Canaviais	Morrinhos- GO	49W 05' 58"/ 17S 43' 53"
16/nov	B 46	RONDONÓPOLIS - MT	2008	Solo- Canaviais	Rondonópolis- MT	54W 38' 07"/ 16S 28' 15"
16/nov	B 47	RONDONÓPOLIS - MT	2008	Solo- Canaviais	Rondonópolis- MT	54W 38' 07"/ 16S 28' 15"
16/nov	B 48	RONDONÓPOLIS - MT	2008	Solo- Canaviais	Rondonópolis- MT	54W 38' 07"/ 16S 28' 15"
08/nov	B 49	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	2008	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	48W 33' 29"/ 22S 29' 42"
08/nov	B 50	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	2008	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	48W 33' 29"/ 22S 29' 42"
08/nov	B 51	USINA DA BARRA (SEDE)	2008	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	48W 33' 29"/ 22S 29' 42"
11/nov	B 52	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	2008	Solo- Feijão	Sebastianópolis do Sul- SP	49W 55' 16"/ 20S 39' 19"
11/nov	B 53	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	2008	Solo- Feijão	Sebastianópolis do Sul- SP	49W 55' 16"/ 20S 39' 19"
11/nov	B 54	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	2008	Solo- Feijão	Sebastianópolis do Sul- SP	49W 55' 16"/ 20S 39' 19"
08/nov	B 55	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	2008	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	48W 33' 29"/ 22S 29' 42"
08/nov	B 56	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	2008	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	48W 33' 29"/ 22S 29' 42"
08/nov	B 57	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	2008	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	48W 33' 29"/ 22S 29' 42"
08/nov	B 58	MACATUBA- SP	2008	Solo- Sorgo	Macatuba- SP	48W 42' 40"/ 22S 30' 08"
08/nov	B 59	MACATUBA- SP	2008	Solo- Sorgo	Macatuba- SP	48W 42' 40"/ 22S 30' 08"
11/nov	B 60	USINA MONÇÕES- SP	2008	Solo- Canaviais	Monções- SP	48W 42' 40"/ 22S 30' 08"
11/nov	B 61	USINA MONÇÕES- SP	2008	Solo- Canaviais	Monções- SP	48W 42' 40"/ 22S 30' 08"
11/nov	B 62	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	2008	Solo- Milho	Sebastianópolis do Sul- SP	49W 55' 16"/ 20S 39' 19"
11/nov	B 63	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	2008	Solo- Milho	Sebastianópolis do Sul- SP	49W 55' 16"/ 20S 39' 19"
13/nov	B 64	BARBOSA- SP	2008	Solo- Sorgo	Barbosa- SP	49W 56' 56"/ 21S 15' 60"
13/nov	B 65	BARBOSA- SP	2008	Solo- Sorgo	Barbosa- SP	49W 56' 56"/ 21S 15' 60"
16/nov	B 66	GRUPO LDC (DREYFUS)	2008	Solo- Milho	Rio Brilhante- MS	54W 32' 47"/ 21S 48' 08"
16/nov	B 67	GRUPO LDC (DREYFUS)	2008	Solo- Milho	Rio Brilhante- MS	54W 32' 47"/ 21S 48' 08"
17/nov	B 68	ITAPORÃ- MS	2008	Solo- Milho	Itaporã- MS	54W 47' 21"/ 22S 04' 45"
17/nov	B 69	ITAPORÃ- MS	2008	Solo- Soja	Itaporã- MS	54W 47' 21"/ 22S 04' 45"
17/nov	B 70	ITAPORÃ- MS	2008	Solo- Soja	Itaporã- MS	54W 47' 21"/ 22S 04' 45"
20/out	B 71	DOURADOS- MS	2008	Solo- Milho	Dourados- MS	54W 48' 20"/I 22S 13' 17"
20/out	B 72	DOURADOS- MS	2008	Solo- Milho	Dourados- MS	54W 48' 20"/I 22S 13' 17"

Tabela 5 - Relação dos isolados de *Beauveria* sp. obtidos de insetos de diferentes regiões.

ISOLADOS DE BEAUVERIA OBTIDOS DAS AMOSTRAS INSETOS						
DATA DE COLETA	CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	ANO DE COLETA	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	LONGITUDE/LATITUDE
07/abr	B 7	FAZENDA SÃO JUDAS	2008	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
07/abr	B 8	FAZENDA SÃO JUDAS	2008	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
07/abr	B 9	FAZENDA SÃO JUDAS	2008	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
07/abr	B 10	FAZENDA SÃO JUDAS	2008	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
07/abr	B 11	FAZENDA SÃO JUDAS	2008	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
07/abr	B 12	FAZENDA SÃO JUDAS	2008	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
15/abr	B 14	FAZENDA SÃO JUDAS	2008	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
15/abr	B 15	FAZENDA SÃO JUDAS	2008	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
15/abr	B 16	FAZENDA SÃO JUDAS	2008	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
04/abr	B 24	USINA SÃO MARTINHO	2008	<i>Sphenophorus levis</i>	Desconhecido	Desconhecido
04/abr	B 25	USINA SÃO MARTINHO	2008	<i>Sphenophorus levis</i>	Desconhecido	Desconhecido
04/abr	B 26	USINA SÃO MARTINHO 2	2008	<i>Sphenophorus levis</i>	Desconhecido	Desconhecido
04/abr	B 27	USINA SÃO MARTINHO 2	2008	<i>Sphenophorus levis</i>	Desconhecido	Desconhecido
10/jun	B 37	COLOMBO - PR	1998	<i>Thelosia camina</i>	Colombo- PR	49W 13' 27"/ 25S 17' 31"

Tabela 6 - Relação dos isolados de *Metathizium* sp. obtidos de Empresas.

ISOLADOS COMERCIAIS						
DATA DE COLETA	CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	ANO DE COLETA	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	LONGITUDE/LATITUDE
10/jan	M 1	COMERCIAL 1	2011	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 2	COMERCIAL 2	2008	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 3	COMERCIAL 3	2008	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 4	COMERCIAL 4	2008	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 6	COMERCIAL 6	2008	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 8	COMERCIAL 7	2008	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 9	COMERCIAL 8	2008	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 10	COMERCIAL 9	2008	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 11	COMERCIAL 10	2008	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 12	COMERCIAL 11	2008	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
04/abr	M 13	COMERCIAL 13	2008	desconhecido	Catiguá-SP	49W 03' 30"/ 21S 02' 58"
04/abr	M 14	COMERCIAL 14	2008	desconhecido	Catiguá- SP	49W 03' 30"/ 21S 02' 58"
04/abr	M 15	COMERCIAL 15	2008	desconhecido	Catiguá-SP	49W 03' 30"/ 21S 02' 58"
04/abr	M 16	COMERCIAL 16	2008	desconhecido	Catiguá- SP	49W 03' 30"/ 21S 02' 58"
04/abr	M 17	COMERCIAL 17	2008	desconhecido	Catiguá- SP	49W 03' 30"/ 21S 02' 58"

Tabela 7 - Relação dos isolados de *Metathizium* sp. obtidos de Instituição de Pesquisa.

ISOLADOS DE INSTITUTOS DE PESQUISA						
DATA DE COLETA	CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	ANO DE COLETA	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	LONGITUDE/LATITUDE
04/abr	M 5	ESALQ PL49	2010	<i>Mahanarva posticata</i>	desconhecido	
29/jul	M 18	UEL 50 - 1	2009	<i>Stegana Catanea</i>	Londrina-PR	51W 09' 45"/23S 18' 38"
08/jun	M 19	CG 291- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> - USDA- ARS (ARSEF 324; CSIRO FI-985)	2009	<i>Austracris guttulosa</i>	Queensland - Austrália	
08/jun	M 20	CG 442- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> - USDA- ARS (ARSEF ; IMI 324673)	2009	<i>Zonocerus elegans</i>	Tanzânia	
08/jun	M 21	CG 29- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2009	<i>Deois flavopcta</i>	Manaus- Amazônas	60W 01' 30"/35 06' 07"
08/jun	M 22	CG 30- Esalq - <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2009	<i>Deois flavopcta</i>	Espírito Santo	35W 18' 33"/6S 19' 56"
08/jun	M 23	CG 31- Esalq - <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2009	<i>Deois flavopcta</i>	Rio de Janeiro	43W 12' 27"/22S 54' 11"
08/jun	M 24	CG 59- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2009	<i>Deois flavopcta</i>	Mato Grosso	59W 57' 00"/ 15S 00' 00"
08/jun	M 25	CG 125- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2009	<i>Manolonion annulipes</i>	Santa Isabel- Pará	48W 18' 59"/ 6S 07' 01"
08/jun	M 26	CG 147- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> - Embrapa Arroz e Feijão (CP3; ARSEF 759)	2009	<i>Deois flavopcta</i>	Goiânia- Goiás	49W 15' 13"/ 16S 40' 44"
08/jun	M 27	CG 293- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> - USDA- ARS (ARSEF 797)	2009	<i>Ancognatha scarabacoides</i>	Colômbia	
08/jun	M 28	CG 426- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> - UFGO	2009	<i>Migdolus sp.</i>	Goiania- Goiás	49W 15' 13"/ 16S 40' 44"
08/jun	M 29	CG 581- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2009	<i>Deois flavopcta</i>	Colinas do Tocantins- Tocantins	48W 28' 29"/ 8S 03' 34"
08/jun	M 30	CG 632- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2009	<i>Acromymex sp.</i>	Distrito Federal - Brasília	47W 55' 48"/ 15S 46' 48"
08/jun	M 31	CG 799- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> - UFGO	2009	<i>Mahanarva posticata</i>	Goianésia- Goiás	49W 07' 03"/ 15S 19' 04"
08/jun	M 32	CG 825- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2009	<i>Eupalamides didalus</i>	Tailândia	
08/jun	M 33	CG 835- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2009	<i>Scaptocoris catanea</i>	Dom Aquino- Mato Grosso	54W 55' 04"/ 15S 48' 39"
08/jun	M 34	CG 320- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> - USDA	2009	<i>Xyloryctes jamaicensis</i>	Samoa Ocidental - EUA	
08/jun	M 35	CG 439- <i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> - USDA- ARS (ARSEF 2024; CBS 700.74)	2009	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	USDA- ARS- França	
08/jun	M 36	CG 645- <i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> - CSIRO	2009	<i>Pemphigus trehermi</i>	Reino Unido	
13/jun	M 37	Ma 283- <i>Metarhizium anisopliae</i> - UEL	2009	Solo	Sapezal- Mato Grosso	58W 45' 51"/ 12S 59' 22"
13/jun	M 38	Ma 36- <i>Metarhizium anisopliae</i> - UEL	2009	Solo	Rolândia- Paraná	51W 22' 09"/ 23S 18' 36"
29/jul	M 39	IBC 59 - Instituto Biológico	2009	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
29/jul	M 40	IBC 156 - Instituto Biológico	2009	Solo	Cascável- PR	38W 14' 30"/ 4S 07' 60"
29/jul	M 42	IBC 185- Instituto Biológico	2009	desconhecido	desconhecido	
29/jul	M 43	IBC 383- Instituto Biológico	2009	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Água Branca -PB	37W 39' 00"/ 7S 30' 00"
29/jul	M 44	IBC 425 - Instituto Biológico	2009	Solo Mata Atlântica	Iporanga - SP	48W 35' 35"/ 24S 35' 09"
29/jul	M 45	IBC 630- Instituto Biológico	2009	desconhecido	desconhecido	Desconhecido
29/jul	M 46	IBC 631 - Instituto Biológico	2009	desconhecido	desconhecido	Desconhecido

Tabela 8 - Relação dos isolados de *Metathizium* sp. obtidos de coletas de solos em culturas agrícolas de diferentes regiões.

ISOLADOS DE BEAUVERIA OBTIDOS DAS AMOSTRAS DE SOLO						
DATA DE COLETA	CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	ANO DE COLETA	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	LONGITUDE/LATITUDE
40272	M 7	Solo Santa Mercedes 2	2008	solo	Santa Mercedes- SP	51W 45' 19"/ 21S 21' 04"
06/jul	M 47	Solo 43- Analândia - S.P.	2009	Solo -cana	Analândia- SP	47W 39' 46"/ 22S 07' 35"
06/jul	M 48	Solo 19- Usina Rio Vermelho	2009	Solo -cana	Junqueirópolis- SP	51W 26' 01"/ 21S 30' 54"
06/jul	M 49	Solo 20- Usina Rio Vermelho	2009	Solo -cana	Junqueirópolis- SP	51W 26' 01"/ 21S 30' 54"
06/jul	M 50	Solo 51- Paraguaçu Paulista	2009	Solo -cana	Paraguaçu Paulista-SP	50W 34' 32"/ 22S 24' 47"
06/jul	M 51	Solo 48- Paraguaçu Paulista	2009	Solo -cana	Paraguaçu Paulista- SP	50W 34' 32"/ 22S 24' 47"
01/jun	M 52	Solo 55- Usina Quatá- S.P.	2009	Solo -cana	Quatá- SP	50W 41' 54"/ 22S 14' 51"
28/mai	M 53	Solo 65- Usina Central Energética Faz boa Esperança	2009	Solo -cana	Cachoeira Alta- GO	50W 56' 29"/18S 45' 48"
22/mai	M 54	Solo 26- Usina Rio Vermelho	2009	Solo-pasto	Junqueirópolis- SP	51W 26' 01"/ 21S 30' 54"
12/mai	M 55	Solo 04- Garça S.P.	2009	Solo-pasto	Garça- SP	49W 39' 22"/ 22S 12' 39"
12/mai	M 56	Solo- Usina Bioenergia do Brasil S/A	2009	Solo- cana	Lucélia- SP	51W 01' 08"/ 21S 43' 14"
30/abr	M 57	Solo 13- Águas de Santa Barbara- S.P.	2009	Solo-pasto	Águas de Santa Barbara -SP	49W 14' 19"/ 22S 52' 51"
22/mai	M 58	Solo 25- Usina Rio Vermelho	2009	Solo-cana	Santa Mercedes- SP	51W 45' 19"/ 21S 21' 04"
28/mai	M 59	Solo 64 - Cachoeira Alta - S.P.- Faz. Boa Esperança	2009	Solo-cana	Cachoeira Alta- GO	50W 56' 29"/18S 45' 48"
30/abr	M 60	Solo 16- Usina TGM	2009	Solo-pasto	Cerqueira César - SP	49W 09' 57"/ 23S 02' 09"
22/mai	M 61	Solo 30- Margem do Rio Paraná	2009	Solo	Paulicéia - SP	51W 49' 49"/ 21S 19' 04"
22/mai	M 62	Solo 19 ² - Usina Rio Vermelho	2009	Cana	Junqueirópolis- SP	51W 26' 01"/ 21S 30' 54"
28/mai	M 63	Solo 63 ² - Fazenda São José	2009	Cana	Cachoeira Alta- GO	50W 56' 29"/18S 45' 48"
28/mai	M 64	Solo 65 ₁ - Fazenda Boa Esperança 2	2009	Cana	Cachoeira Alta- GO	50W 56' 29"/18S 45' 48"
28/mai	M 65	Solo 65 ² - Fazenda Boa Esperança 2	2009	Solo-cana	Cachoeira Alta- GO	50W 56' 29"/18S 45' 48"
28/mai	M 66	Solo 65 ³ - Fazenda Boa Esperança 2	2009	Cana	Cachoeira Alta- GO	50W 56' 29"/18S 45' 48"
28/mai	M 67	Solo 65 ₄ - Fazenda Boa Esperança 2	2009	Cana	Cachoeira Alta- GO	50W 56' 29"/18S 45' 48"
28/mai	M 68	Solo 65 ⁴ ₂ - Fazenda Boa Esperança 2	2009	Cana	Cachoeira Alta- GO	50W 56' 29"/18S 45' 48"
29/jul	M 41	Usina Rio Vermelho	2009	Solo- Cana	Junqueirópolis- SP	51W 26' 01"/ 21S 30' 54"

Tabela 9 - Relação de todos os isolados de *Beauveria* sp. e *Metathizium* sp. obtidos no trabalho relacionados com sua origem.

Quantidade de Isolados obtidos		
Origem	<i>Beauveria</i> sp.	<i>Metathizium</i> sp.
Solos	41	24
Insetos	14	0
Comerciais	4	15
Institutos de Pesquisa	14	29
TOTAL	73	68

Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são as espécies mais conhecidas para o controle de pragas e isso se deve a sua ampla distribuição geográfica, variedade de hospedeiros e ocorrência em condições naturais enzooticamente ou provocando epizootia em algumas espécies de insetos pragas (ALVES, 1998). Além disso, são os mais fáceis de serem isolados, tanto de insetos, quanto de partes de plantas ou do solo, por isso o interesse científico sobre o controle de pragas com esses microrganismos (ALMEIDA & BATISTA, 2001). MacLeod (1954) descreveu o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. como sendo o patógeno mais comumente encontrado na natureza. Os resultados deste trabalho corroboram com esta definição, pois pode-se concluir que a frequência de *B. bassiana* em amostras de solos e insetos foi maior do que a de *M. anisopliae*. Esses dados estão de acordo com o hábitat desses fungos descritos na literatura.

Rodrigues (2009) conseguiu isolar linhagens de *B. bassiana* e *M. anisopliae* tanto de amostras de solos como de insetos, demonstrando resultados similares a este estudo para *B. bassiana*.

Desta maneira, para estudos ecológicos, é essencial considerar o contexto em que os isolados são coletados, as interações que eles podem ter uns com os outros, os organismos de acolhimento e do meio ambiente.

Esses resultados permitem concluir que os fungos *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. são freqüentes nas plantações agrícolas, parasitando insetos ou livres nos solos.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Beauveria* sp. E *Metarhizium* sp. SOBRE TODAS AS FASES DO CICLO DE *Diatraea Saccharalis*

1- INTRODUÇÃO

O setor sucroenergético 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 e 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 alvos e ambientes a serem controlados 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.

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 diferentes isolados e selecionar os mais eficientes para controle da *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.

Setenta e três isolados de *Beauveria* sp. e sessenta e oito isolados de *Metarhizium* sp. obtidos na etapa de isolamento foram utilizados no presente estudo. Os isolados são originários de diversas regiões geográficas brasileiras e de diferentes hospedeiros ou substratos. Essas informações estão disponíveis nas tabelas 2 a 8

2.3 Obtenção dos indivíduos 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.

Adquiridos os insetos, estes foram levados para o laboratório, lavados em água corrente e em seguida imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante cinco minutos. Posteriormente, eram enxaguados em água destilada estéril e secos em papel toalha estéril. Este procedimento proporcionava a assepsia da cutícula de larvas e pupas de *Diatraea saccharalis*. Os adultos eram provenientes de pupas que já haviam passado por este procedimento. Com relação aos ovos, estes foram previamente desinfetados por imersão em uma solução de NaClO com concentração de 0,05% por dois minutos e, posteriormente, em uma solução de sulfato de cobre CuSO₄ a 17% por mais dois minutos.

2.4 Preparo das suspensões de inóculo e viabilidade dos conídios.

Os 73 isolados de *Beauveria* sp. e 68 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 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 *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. sobre ovos, lagartas, crisálidas e adultos de *Diatraea saccharalis*

Isolados de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. foram testados quanto à agressividade em massas de ovos, lagartas, pupas e adultos de *D. saccharalis*. Todos os experimentos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de $26^\circ\text{C} \pm 2$ e com umidade relativa do ar entre 70% e 80%. Em razão do grande número de isolados fúngicos, o experimento foi dividido em etapas. Os experimentos foram realizados com grupos de cinco isolados e uma testemunha inoculada com água estéril e espalhante adesivo (0,01% de Tween 20). Cada isolado fúngico foi testado em 25 indivíduos, com exceção das massas de ovos, divididas em cinco placas de Petri.

Foram considerados como mais agressivos aqueles isolados cuja taxa de parasitismo e morte, tiver um número de indivíduos superior ao da testemunha. Observações diárias foram realizadas para registrar a mortalidade dos indivíduos durante sete dias. Nesse período, foi calculada, para cada isolado, a mortalidade acumulada [= (número de indivíduos mortos/número total de indivíduos)*100].

Para avaliar os isolados quanto à agressividade a todas as fases do ciclo da praga, foi utilizada a média aritmética ponderada calculada utilizando os pesos atribuídos na tabela 9 [Média de Infectividade = (percentual infectividade de ovos*peso)+(percentual infectividade de lagartas*peso)+(percentual infectividade de crisálidas*peso)+(percentual infectividade de adultos*peso))/10].

Tabela 10. Pesos atribuídos para analisar quantitativamente a eficiência da capacidade de infecção dos diferentes isolados de *Beauveria* sp e *Metarhizium* sp considerando todas as fases do ciclo de *Diatraea saccharalis*.

FASES DO CICLO DA <i>D. saccharalis</i>	PESOS PARA CALCULAR A MÉDIA PONDERADA DO PARASITISMO
OVOS	3
LAGARTAS	4
CRISÁLIDAS	1
MARIPOSAS	2

2.6 Avaliação da virulência sobre massas de ovos

Posturas de *D. saccharalis* ovopositadas em folhas de papel foram previamente desinfetadas conforme metodologia descrita no item 2.3, recortadas e distribuídas em placas de Petri (aproximadamente 100 ovos por placa) com papel filtro umedecido. Os ovos foram pulverizados com 1mL da suspensão de esporos de cada isolado de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. (10^8 esporos /mL) e mantidos a $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar entre 70 e 80%. O experimento foi conduzido com 72 e 68 tratamentos e cinco repetições de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp., respectivamente. Cada repetição foi constituída de uma placa de Petri com aproximadamente 100 ovos. Os ovos foram avaliados diariamente durante 10 dias, pela contagem do número de ovos parasitados pelo fungo.

2.7 Avaliação da virulência sobre lagartas

Os tratamentos foram compostos por placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo 25 lagartas de *D. saccharalis* previamente desinfetadas conforme metodologia descrita no item 2.3, variando entre o 3º e 4º instar de desenvolvimento. Cada grupo com 25 lagartas (repetição) foi pulverizado com 1mL de suspensão de esporos de cada isolado de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. (10^8 esporos /mL). Posteriormente à pulverização, as lagartas foram 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. As placas foram mantidas em sala climatizada na temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar entre 70 e 80%. A cada dois dias, os pedaços de colmo de cana-de-açúcar foram substituídos por pedaços novos. Durante 10 dias, cada isolado foi avaliado individualmente, através da contagem do número de indivíduos parasitados pelo fungo.

2.8 Avaliação da virulência sobre crisálidas

Vinte e cinco pupas de *D. saccharalis* com 25 dias de vida, previamente desinfetadas conforme metodologia descrita no item 2.3, foram pulverizadas com 1mL

de suspensão de esporos de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. (10^8 esporos /mL) de cada isolado. Posteriormente à pulverização, as pupas foram individualizadas em placas de Petri e mantidas em sala climatizada na temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%. Cada isolado foi avaliado individualmente e diariamente, durante 10 dias, por meio da contagem do número de crisálidas parasitadas pelo fungo.

2.9 Avaliação da virulência sobre adultos

Vinte e cinco adultos de *D. saccharalis* recém-eclodidos de pupas foram recolhidos em tubos de ensaio de fundo chato e transferidos para placa de Petri onde foram pulverizados com 1mL de suspensão de esporos de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. (10^8 esporos /mL) de cada isolado. Posteriormente à pulverização, os adultos foram individualizadas em placas de Petri contendo um pedaço de algodão embebido em solução de melaço e mantidas em sala climatizada na temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%. A cada dois dias os pedaços de algodão embebidos em melaço foram substituídos por novos. Os tratamentos foram avaliados individualmente e diariamente, durante 10 dias, por meio da contagem do número de indivíduos parasitados pelo fungo.

2.10 Agrupamento por Similaridade

Para melhor visualizar a similaridade dos isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. em relação ao seu potencial de parasitismo foi construído um dendrograma com os dados de agressividade a partir de uma análise de agrupamento, utilizando as medidas de similaridade baseadas no índice de Jaccard e as medidas de distância Euclidianas utilizando o programa PAST (HAMMER et al., 2001).

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da virulência de isolados de *Beauveria* sp.

Nos bioensaios, os isolados estudados apresentaram grande variabilidade quanto à virulência sobre todas as fases do ciclo de *Diatraea saccharalis*. Ao término das avaliações, foi possível constatar que todos os 73 isolados do fungo *Beauveria* sp. foram patogênicos à broca da cana-de-açúcar em alguma fase do seu ciclo (Tabela 10). A testemunha não apresentou mortalidade dos insetos, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos.

Ao longo dos experimentos, foram observadas variações nos índices de parasitismo em função tanto do isolado como da fase do ciclo de *Diatraea saccharalis* a ser analisada. Segundo 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. A média ponderada do percentual do parasitismo esteve entre 13% a 97% (Figura 4), sendo que os isolados com maior potencial de patogenicidade em relação ao ciclo completo da *D. saccharalis* foram B 38, B 58 e B 67, com média de percentual de infectividade acima de 90%. Estes isolados foram obtidos de amostras de solos (Tabela 4). Giometti et al. (2006), ao realizar estudos de teste de seleção de isolados do fungo entomopatogênico *B. bassiana* em condições de laboratório, também observaram altos índices de mortalidade de *D. saccharalis* para alguns isolados, corroborando assim com os dados obtidos nesse trabalho. No entanto, ele observou mortalidade para o isolado IBCB 215 acima de 95,8% para lagartas de *D. saccharalis*, o que difere deste trabalho, onde este mesmo isolado ocasionou apenas 45% de mortalidade. Em contrapartida, alguns isolados como B 8, B 20, B 27, B 30, B 31 e B 32 demonstraram baixo potencial de patogenicidade, com média de percentual de infectividade abaixo de 20%.

O fenótipo de cada isolado de *Beauveria* sp. em relação à infectividade ao ciclo completo da *D. saccharalis* foi expresso na tabela 11, demonstrando alta variabilidade existente dentro de uma mesma espécie.

Tabela 11. Percentuais de infectividade de diferentes isolados de *Beauveria* sp. em diferentes fases do ciclo de *Diatraea saccharalis*, 10 dias após exposição. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

ISOLADO	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTAS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISALIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	*MÉDIA DO PARASITISMO (%)
B 1	60	45	14	72	51,8
B 2	20	0	0	80	22
B 3	20	10	57	44	24,5
B 4	0	80	4	100	52,4
B 5	100	40	96	100	75,6
B 6	80	0	38	48	37,4
B 7	40	10	5	36	23,7
B 8	0	20	0	44	16,8
B 9	100	35	10	0	45
B 10	100	0	14	92	49,8
B 11	20	20	5	72	28,9
B 12	0	10	24	80	22,4
B 13	0	96	96	100	68
B 14	0	5	0	92	20,4
B 15	100	35	10	68	58,6
B 16	0	50	0	68	33,6
B 17	0	92	100	100	66,8
B 18	0	88	0	100	55,2
B 19	0	92	80	100	64,8
B 20	0	5	14	64	16,2
B 21	60	50	5	0	38,5
B 22	0	60	0	80	40
B 23	20	30	14	4	20,2
B 24	40	15	0	68	31,6
B 25	80	85	14	8	61
B 26	100	100	5	0	70,5
B 27	20	0	0	36	13,2
B 28	60	45	14	80	53,4
B 29	80	0	71	48	40,7
B 30	40	0	0	32	18,4
B 31	0	0	5	64	13,3
B 32	20	0	14	36	14,6
B 33	60	15	10	68	38,6
B 34	80	40	0	68	53,6

ISOLADO	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTAS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISALIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	*MÉDIA DO PARASITISMO (%)
B 35	80	20	14	72	47,8
B 36	20	0	10	76	22,2
B 37	60	15	29	100	46,9
B 38	100	84	84	100	92
B 39	0	16	96	100	36
B 40	60	76	76	100	76
B 41	0	60	8	100	44,8
B 42	0	64	4	100	46
B 43	0	16	96	100	36
B 44	0	100	96	100	69,6
B 45	0	72	96	100	58,4
B 46	0	16	80	100	34,4
B 47	0	80	88	100	60,8
B 48	0	64	100	100	55,6
B 49	0	36	100	100	44,4
B 50	0	40	100	100	46
B 51	0	64	100	100	55,6
B 52	0	76	100	100	60,4
B 53	0	40	24	100	38,4
B 54	0	68	44	100	51,6
B 55	20	84	100	100	69,6
B 56	0	60	100	100	54
B 57	0	52	100	100	50,8
B 58	100	96	80	100	96,4
B 59	0	48	100	100	49,2
B 60	40	88	100	100	77,2
B 61	20	52	100	100	56,8
B 62	0	60	0	100	44
B 63	40	64	100	100	67,6
B 64	40	60	100	100	66
B 65	20	76	100	100	66,4
B 66	0	56	100	100	52,4
B 67	100	96	84	100	96,8
B 68	0	56	100	100	52,4
B 69	20	72	100	100	64,8
B 70	20	60	100	100	60
B 71	0	64	100	100	55,6

ISOLADO	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTAS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISALIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	*MÉDIA DO PARASITISMO (%)
B 72	0	40	72	100	43,2
B 73	0	20	0	100	28
Controle	0	0	0	0	0

*Média Ponderada do Percentual de Parasitismo.

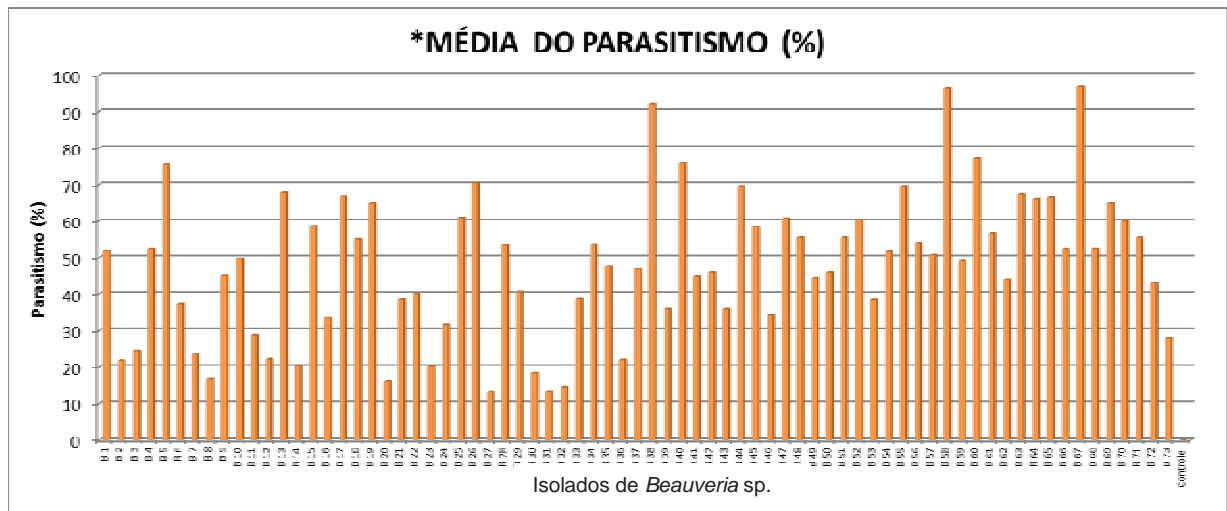


Figura 6. Média dos Percentuais de infectividade em todas as fases do ciclo de *D. saccharalis* por diferentes isolados de *Beauveria* sp.. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

Tabela 12. Variabilidade do Fenótipo dos diferentes isolados de *Beauveria* sp. em relação a infectividade das diferentes fases do ciclo de *Diatraea saccharalis*. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

ISOLADO	AGRESSIVIDADE (%) EM OVOS	AGRESSIVIDADE (%) EM LAGARTAS	AGRESSIVIDADE (%) EM CRISALIDA	AGRESSIVIDADE (%) EM MARIPOSA
B 1	+++	++	+	+++
B 2	+	-	-	+++
B 3	+	+	++	++
B 4	-	+++	+	++++
B 5	++++	++	++++	++++
B 6	+++	-	++	++
B 7	++	+	+	++

ISOLADO	AGRESSIVIDADE (%) EM OVOS	AGRESSIVIDADE (%) EM LAGARTAS	AGRESSIVIDADE (%) EM CRISALIDA	AGRESSIVIDADE (%) EM MARIPOSA
B 8	-	+	-	++
B 9	++++	++	++	-
B 10	++++	-	+	++++
B 11	+	+	+	+++
B 12	-	+	+	+++
B 13	-	++++	++++	++++
B 14	-	+	-	++++
B 15	++++	++	+	+++
B 16	-	++	-	+++
B 17	-	++++	++++	++++
B 18	-	+++	-	++++
B 19	-	++++	+++	++++
B 20	-	+	+	+++
B 21	+++	++	+	-
B 22	-	+++	-	+++
B 23	+	++	+	+
B 24	++	+	-	+++
B 25	+++	+++	+	+
B 26	++++	++++	+	-
B 27	+	-	-	++
B 28	+++	++	+	+++
B 29	+++	-	+++	++
B 30	++	-	-	++
B 31	-	-	+	+++
B 32	+	-	+	++
B 33	+++	+	+	+++
B 34	+++	++	-	+++
B 35	+++	+	+	+++
B 36	+	-	+	+++
B 37	+++	+	+	++++
B 38	++++	+++	+++	++++
B 39	-	+	++++	++++
B 40	+++	+++	+++	++++
B 41	-	+++	+	++++
B 42	-	+++	+	++++
B 43	-	+	++++	++++

ISOLADO	AGRESSIVIDADE (%) EM OVOS	AGRESSIVIDADE (%) EM LAGARTAS	AGRESSIVIDADE (%) EM CRISALIDA	AGRESSIVIDADE (%) EM MARIPOSA
B 44	-	++++	++++	++++
B 45	-	+++	++++	++++
B 46	-	+	+++	++++
B 47	-	+++	+++	++++
B 48	-	+++	++++	++++
B 49	-	++	++++	++++
B 50	-	++	++++	++++
B 51	-	+++	++++	++++
B 52	-	+++	++++	++++
B 53	-	++	+	++++
B 54	-	+++	++	++++
B 55	+	+++	++++	++++
B 56	-	+++	++++	++++
B 57	-	++	++++	++++
B 58	++++	++++	+++	++++
B 59	-	++	++++	++++
B 60	++	+++	++++	++++
B 61	+	++	++++	++++
B 62	-	+++	-	++++
B 63	++	+++	++++	++++
B 64	++	+++	++++	++++
B 65	+	+++	++++	++++
B 66	-	++	++++	++++
B 67	++++	++++	+++	++++
B 68	-	++	++++	++++
B 69	+	+++	++++	++++
B 70	+	+++	++++	++++
B 71	-	+++	++++	++++
B 72	-	++	+++	++++
B 73	-	+	-	++++

- não houve infectividade, + de 0 a 29% de infectividade, ++ de 30 a 59% de infectividade, +++ de 60 a 90% de infectividade e ++++ acima de 90% de infectividade.

3.1.1 Avaliação da virulência de isolados de *Beauveria* sp. sobre ovos de *D. saccharalis*

O percentual médio de infectividade do fungo aos ovos variou de 0% a 100% quando expostos aos conídios de *Beauveria* sp. (Figura 5).

Os isolados mais virulentos de *Beauveria* sp. para ovos de *D. saccharalis* foram B 5, B 9, B10, B 15, B 26, B 38, B 58 e B 6, os quais promoveram um percentual médio de 100% (Figura 5).

Os melhores resultados foram obtidos para isolados provenientes de *D. saccharalis* (B 9, B10 e B15), evidenciando a especificidade entre o patógeno e hospedeiro. Alves (1998) ressaltou a importância dessas relações, considerando para isso aspectos da biologia, genética e comportamento de cada organismo em relação ao ambiente que está inserido.

No entanto, a maioria dos isolados não promoveram infectividade alguma, pois todos os ovos eclodiram normalmente, enquanto que os ovos infectados além de apresentarem o fungo crescendo sobre os ovos, os mesmos não eclodiam. Já no tratamento controle observou-se 99% de eclosão dos ovos.

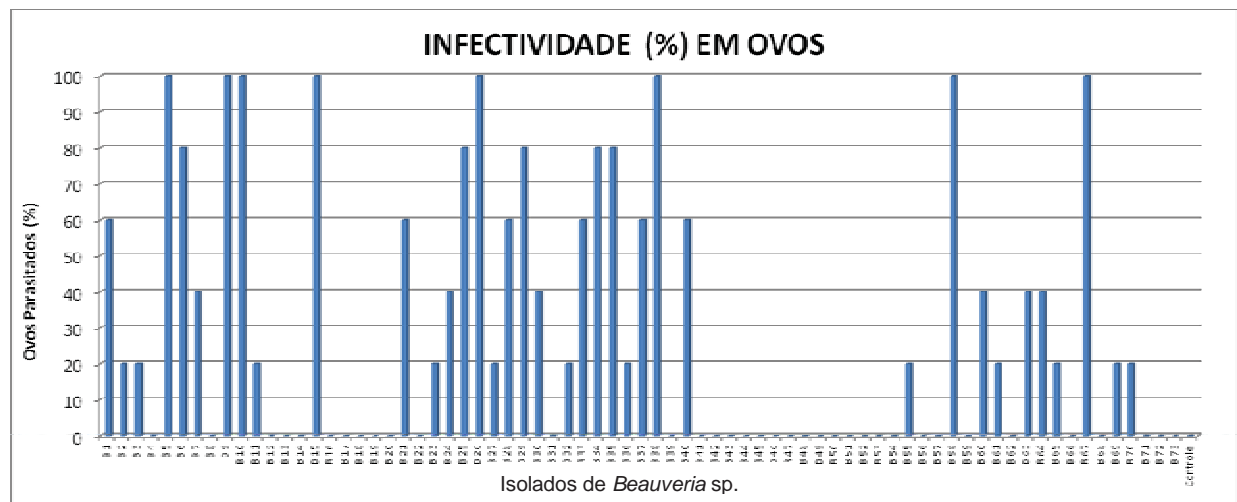


Figura 7. Percentuais de infectividade de diferentes isolados de *Beauveria* sp. sobre ovos de *D. saccharalis*. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

3.1.2 Avaliação da virulência de isolados de *Beauveria* sp. sobre lagartas de *D. saccharalis*

Para lagartas de *D. saccharalis*, o percentual de infectividade também variou de 0% a 100% (Figura 6).

Os isolados B 26 e B 44 foram os mais virulentos para lagartas de *D. saccharalis* com 100% de infectividade. Em contrapartida, os isolados B 2, B 6, B 10, B 27, B 29, B 30, B 31, B 32 e B 36 não causaram infectividade em lagartas de *D. saccharalis*. Na testemunha, todas as lagartas se transformaram em pupas, dando continuidade ao ciclo, já nos tratamentos com os isolados, as lagartas infectadas apresetavam inicialmente coloração rósea e corpo endurecido e posteriormente micélio crescendo sobre o seu corpo, impedindo o empupamento, levando as lagartas à morte.

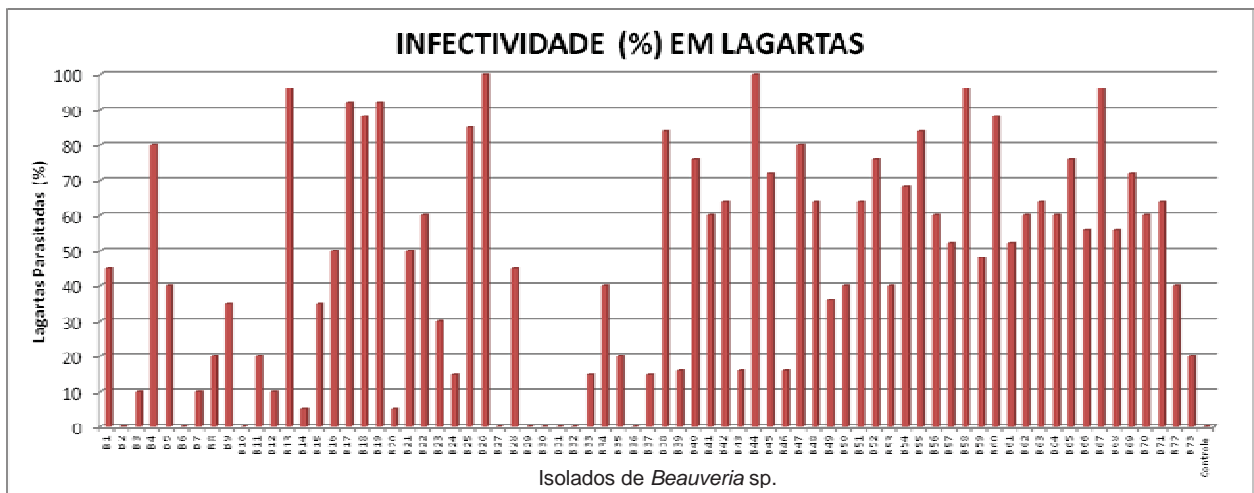


Figura 8. Percentuais de infectividade de diferentes isolados de *Beauveria* sp. para lagartas de *D. saccharalis*. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

3.1.3 Avaliação da virulência de isolados de *Beauveria* sp. sobre crisálidas de *D. saccharalis*

Em pupas de *D. saccharalis*, o percentual de infectividade também variou de 0% a 100%.

Os isolados B 17, B 48, B 49, B 50, B 51, B 52, B 55, B 56, B 57, B 59, B 60, B 61, B 63, B 64, B 65, B 66, B 68, B 69, B 70, e B 71 foram os mais virulentos para pupas de *D. saccharalis* com 100% de infectividade (Figura 7). No entanto, alguns isolados não apresentaram infectividade em pupas de *D. saccharalis*, onde as mesmas se transformaram em adultos.

Na testemunha, todas as pupas se transformaram em adultos (mariposas).

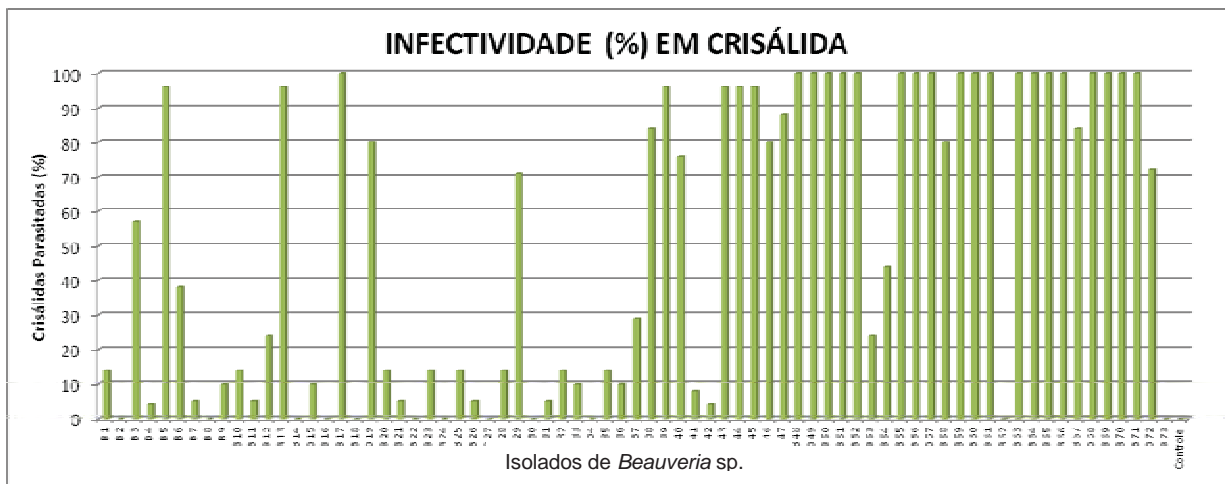


Figura 9. Percentuais de infectividade de diferentes isolados de *Beauveria* sp. sobre crisálidas de *D. saccharalis*. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

3.1.4 Avaliação da virulência de isolados de *Beauveria* sp. sobre adultos de *D. saccharalis*

Os resultados para o tratamento com adultos de *D. saccharalis* demonstraram que estes são mais suscetíveis à infecção por isolados de *Beauveria* sp., comparados a ovos, lagartas e pupas, demonstrando um percentual médio de 0 a 100%, com exceção de B 9, B 21 e B 26, que não promoveram infectividade em adultos de *D. saccharalis*. Os isolados B 3, B 6, B 7, B 8, B 23, B 25, B 27, B 30 e B 32 apresentaram percentual variando de 4% a 44% (Figura 8).

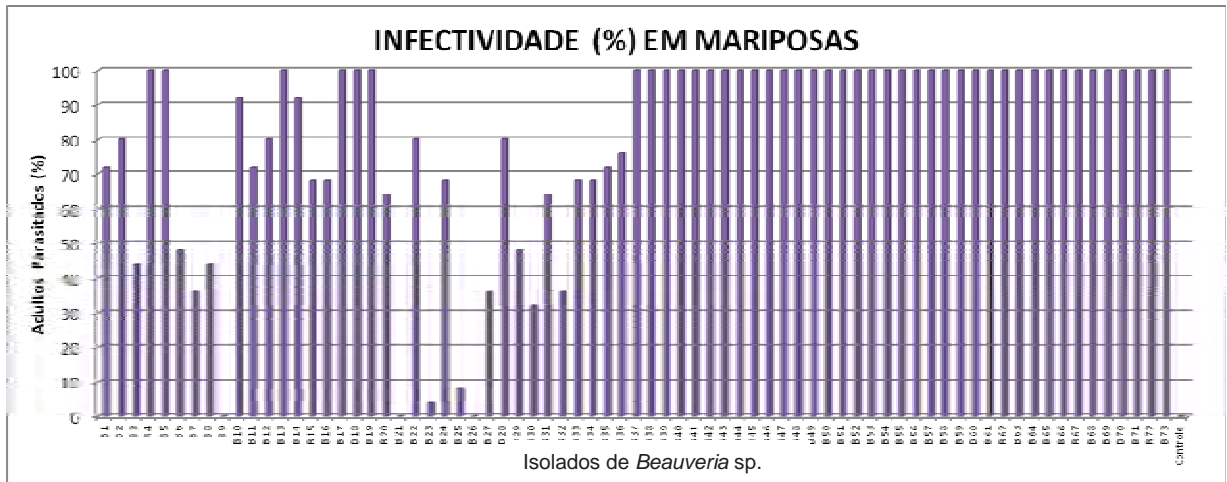


Figura 10 Percentuais de infectividade de diferentes isolados de *Beauveria* sp. para mariposas de *D. saccharalis*. Experimento realizado sobre condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

3.2 Avaliação da virulência de isolados de *Metarhizium* sp.

Nos bioensaios, os isolados estudados apresentaram grande variabilidade quanto à virulência sobre todas as fases do ciclo de *Diatraea saccharalis*. Ao término das avaliações, foi possível constatar que todos os 68 isolados do fungo *Metarhizium* sp. foram patogênicos à broca da cana-de-açúcar em alguma fase do seu ciclo (Tabela 12).

A testemunha não apresentou mortalidade dos insetos, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos.

Ao longo dos experimentos, foram observadas variações nos índices de parasitismo. Os resultados destas variações quantitativamente foram interpretados e demonstrados na tabela 12. Desta maneira, a média do percentual do parasitismo utilizando a média ponderada ficou entre 32% a 100%, sendo que o isolado com maior potencial de patogenicidade em relação ao ciclo completo da *D. saccharalis* foi M 32 (isolado CG 825), com eficiência de infectividade de 100%. Este isolado é um isolado utilizado como referência comparatória. Entretanto, isolados obtidos de solo neste mesmo trabalho, como M 48, M 49, M50, M 53, M 58, M 59 e M 61 demonstraram um alto percentual de infectividade acima de 90%. Desta forma, possuem grande potencial de infectividade sobre todas as fases do ciclo de *D. saccharalis*.

O fenótipo de cada isolado de *Metarhizium* sp. em relação a infectividade ao ciclo completo da *D. saccharalis* foi expresso na Tabela 13, demonstrando alta variabilidade existente dentro de uma mesma espécie.

Tabela 13. Percentuais de infectividade de diferentes fases do ciclo de *Diatraea saccharalis* obtidos 10 dias após exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium* sp. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

ISOLADO	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTAS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISALIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	*MÉDIA DO PARASITISMO (%)
M1	100	16	0	56	54
M2	0	64	0	68	33,6
M3	100	92	100	76	89,6
M4	80	84	0	56	54,8
M5	40	80	0	64	45,6
M6	60	100	0	44	45,6
M7	20	76	80	84	63,2
M8	100	44	96	56	76
M9	80	84	76	48	66,8
M10	100	28	100	40	68,8
M11	100	100	100	52	80,8
M12	100	100	100	80	92
M13	100	68	92	56	77,6
M14	100	44	100	40	70,4
M15	60	64	100	52	65,2
M16	100	100	100	80	92
M17	100	88	100	60	82,8
M18	100	80	92	56	78,8
M19	100	72	100	56	79,6
M20	60	100	100	8	51,2
M21	0	80	100	72	56,8
M22	0	100	100	32	42,8
M23	100	92	100	84	92,8
M24	100	100	100	96	98,4
M25	100	52	100	40	71,2
M26	100	80	100	96	96,4
M27	100	76	100	64	83,2
M28	100	68	100	72	85,6
M29	100	100	100	72	88,8
M30	0	100	100	56	52,4

ISOLADO	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTAS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISALIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	*MÉDIA DO PARASITISMO (%)
M31	0	60	100	52	46,8
M32	100	100	100	100	100
M33	0	100	100	40	46
M34	100	100	100	72	88,8
M35	40	100	100	40	58
M36	0	100	100	72	58,8
M37	100	96	100	52	80,4
M38	60	100	100	60	72
M39	100	80	100	56	80,4
M40	100	100	100	88	95,2
M41	0	80	100	20	36
M42	100	100	100	76	90,4
M43	100	96	100	92	96,4
M44	100	100	100	92	96,8
M45	100	100	100	96	98,4
M46	100	100	100	92	96,8
M47	100	88	100	72	87,6
M48	100	92	100	84	92,8
M49	100	100	100	84	93,6
M50	100	96	100	92	96,4
M51	100	92	100	44	76,8
M52	100	88	100	72	87,6
M53	100	100	100	76	90,4
M54	60	84	100	44	64
M55	100	96	100	72	88,4
M56	100	100	100	68	87,2
M57	100	84	100	48	77,6
M58	100	100	100	84	93,6
M59	100	100	100	84	93,6
M60	100	100	100	56	82,4
M61	100	100	100	92	96,8
M62	0	100	100	64	55,6
M63	0	100	92	36	42,8
M64	0	100	100	60	54
M65	20	100	100	28	47,2
M66	100	100	100	60	84
M67	0	100	100	52	50,8
M68	20	100	100	32	48,8

ISOLADO	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTAS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISALIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	*MÉDIA DO PARASITISMO (%)
Controle	0	0	0	0	0

*Média Ponderada do Percentual de Parasitismo.

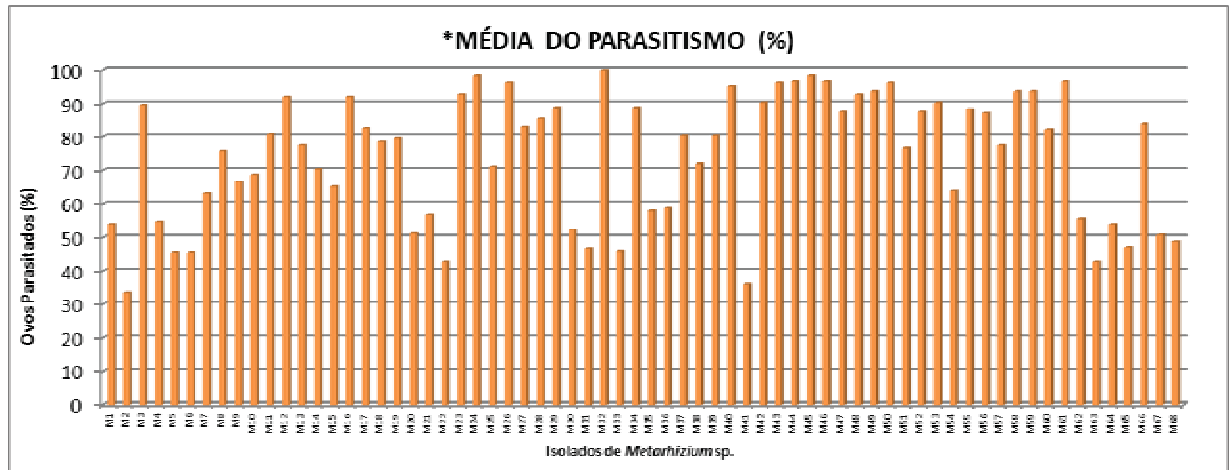


Figura 11. Média dos Percentuais de infectividade em todas as fases do ciclo de *D. saccharalis* por diferentes isolados de *Metarhizium sp.* Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

Tabela 14. Variabilidade do Fenótipo dos diferentes isolados de *Metarhizium sp.* em relação a infectividade das diferentes fases do ciclo de *Diatraea saccharalis*. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

ISOLADO	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTAS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISALIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA
M1	++++	+	-	++
M2	-	+++	-	+++
M3	++++	++++	++++	+++
M4	+++	+++	-	++
M5	++	+++	-	+++
M6	+++	++++	-	++
M7	+	+++	+++	+++
M8	++++	++	++++	++
M9	+++	+++	+++	++
M10	++++	+	++++	++
M11	++++	++++	++++	++
M12	++++	++++	++++	+++
M13	++++	+++	++++	++

ISOLADO	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTAS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISALIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA
M14	++++	++	++++	++
M15	+++	+++	++++	++
M16	++++	++++	++++	+++
M17	++++	+++	++++	+++
M18	++++	+++	++++	++
M19	++++	+++	++++	++
M20	+++	++++	++++	+
M21	-	+++	++++	+++
M22	-	++++	++++	++
M23	++++	++++	++++	+++
M24	++++	++++	++++	++++
M25	++++	++	++++	++
M26	++++	+++	++++	++++
M27	++++	+++	++++	+++
M28	++++	+++	++++	+++
M29	++++	++++	++++	+++
M30	-	++++	++++	++
M31	-	+++	++++	++
M32	++++	++++	++++	++++
M33	-	++++	++++	++
M34	++++	++++	++++	+++
M35	++	++++	++++	++
M36	-	++++	++++	+++
M37	++++	++++	++++	++
M38	+++	++++	++++	+++
M39	++++	+++	++++	++
M40	++++	++++	++++	+++
M41	-	+++	++++	+
M42	++++	++++	++++	+++
M43	++++	++++	++++	++++
M44	++++	++++	++++	++++
M45	++++	++++	++++	++++
M46	++++	++++	++++	++++
M47	++++	+++	++++	+++
M48	++++	++++	++++	+++
M49	++++	++++	++++	+++
M50	++++	++++	++++	++++
M51	++++	++++	++++	++
M52	++++	+++	++++	+++
M53	++++	++++	++++	+++

ISOLADO	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTAS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISALIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA
M54	+++	+++	++++	++
M55	++++	++++	++++	+++
M56	++++	++++	++++	+++
M57	++++	+++	++++	++
M58	++++	++++	++++	+++
M59	++++	++++	++++	+++
M60	++++	++++	++++	++
M61	++++	++++	++++	++++
M62	-	++++	++++	+++
M63	-	++++	++++	++
M64	-	++++	++++	+++
M65	+	++++	++++	+
M66	++++	++++	++++	+++
M67	-	++++	++++	++
M68	+	++++	++++	++

- não houve infectividade, + de 0 a 29% de infectividade, ++ de 30 a 59% de infectividade, +++ de 60 a 90% de infectividade e ++++ acima de 90% de infectividade.

3.2.1 Avaliação da virulência de isolados de *Metarhizium* sp. sobre ovos de *D. saccharalis*

O percentual médio de infectividade de ovos variou de 0% a 100% quando expostos aos conídios de *Metarhizium* sp.

O resultado da avaliação da virulência de *Metarhizium* sp. para ovos de *D. saccharalis* demonstrou que 64% dos isolados utilizados no experimento promoveram uma eficiência de infectividade de 100% (Figura 10), apresentando capacidade elevada de virulência para esta fase do ciclo de *D. saccharalis* inibindo totalmente a eclosão das lagartas. Rampelotti et al. (2007) utilizando o isolado CG 891 de *M. anisopliae*, demonstrou que este isolado era altamente virulento para ovos de *T. limbativentris*, provocando mortalidade acima de 83%. Em um trabalho realizado por Almeida et al. (1984) para ovos de *D. saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) foi observado também elevada virulência de isolados de *M. anisopliae*. Já no tratamento controle observou-se 99% de eclosão dos ovos.

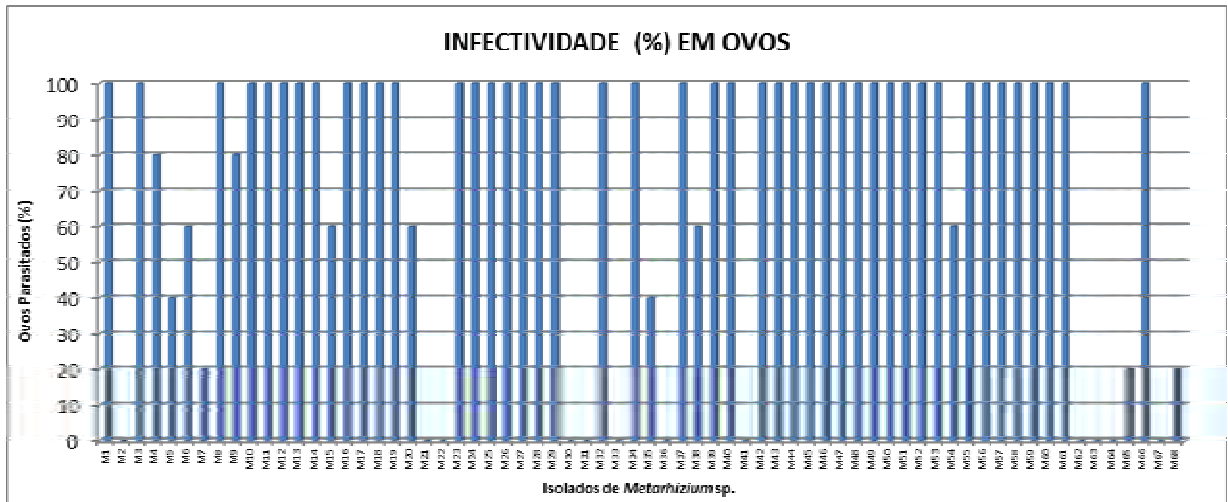


Figura 12. Percentuais de infectividade de diferentes isolados de *Metarhizium* sp. sobre ovos de *D. saccharalis*. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

3.2.2 Avaliação da virulência de isolados de *Metarhizium* sp. sobre lagartas de *D. saccharalis*

Para lagartas de *D. saccharalis* o percentual de infectividade variou de 8% a 100%.

O isolado M 32 (isolado CG 825) foi o mais virulento para lagartas de *D. saccharalis* com 100% de infectividade. Todos os outros isolados foram considerados patogênicos às lagartas de *D. saccharalis*, pois demonstraram percentual de infectividade acima de 30%, com exceção dos isolados M 20 (CG 442), M 41 e M 65 que apresentaram baixa infectividade, abaixo de 30% (Figura 11).

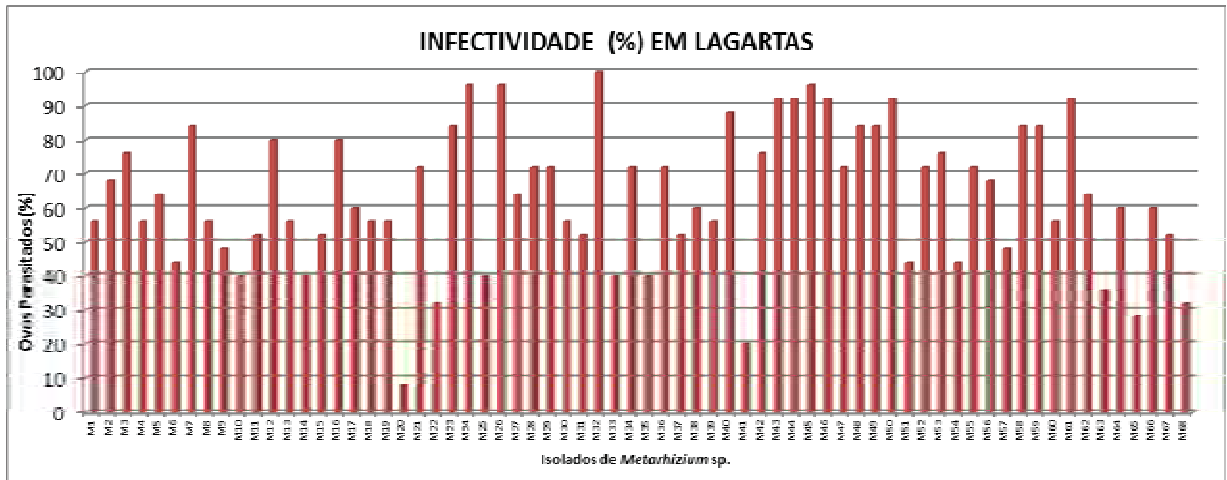


Figura 13. Percentuais de infectividade de diferentes isolados de *Metarhizium* sp. para lagartas de *D. saccharalis*. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

3.2.3 Avaliação da virulência de isolados de *Metarhizium* sp. sobre crisálidas de *D. saccharalis*

Em pupas de *D. saccharalis*, o percentual de infectividade também variou de 16% a 100%.

Para pupas de *D. saccharalis*, os isolados de *Metarhizium* sp. foram altamente virulentos, onde 50% promoveram infectividade de 100% (Figura 12). O restante dos isolados apresentaram percentual médio de infectividade entre 44% e 96%, com exceção dos isolados M 1 (Isolado Comercial) e M 10 (Isolado Comercial) que apresentaram percentual baixo de virulência.

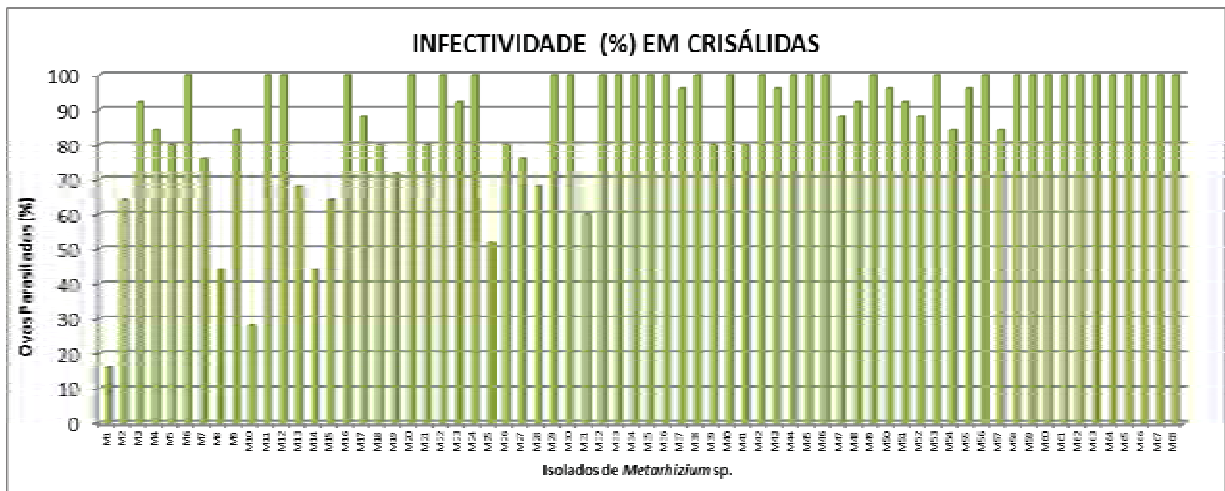


Figura 14. Percentuais de infectividade de crisálidas de *D. saccharalis* por diferentes isolados de *Metarhizium* sp. Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

3.2.4 Avaliação da virulência de isolados de *Metarhizium* sp. sobre adultos de *D. saccharalis*

Os resultados para o tratamento com adultos de *D. saccharalis* demonstraram que estes são mais suscetíveis à infecção por isolados de *Metarhizium* sp., comparados a ovos, lagartas e pupas, demonstrando um percentual médio de 76% a 100%, onde 82% dos isolados promoveram um percentual de infectividade de 100%. Em contrapartida, alguns isolados como M 1(isolado comercial), M 2 (isolado comercial), M 4 (isolado comercial), M 5 (ESALQ PL49) e M 6 (isolado comercial) não promoveram infectividade em adultos de *D. saccharalis* (Figura 13). A infectividade de *Metarhizium* sp. para adultos de *D. saccharalis* é semelhante a causada por *Beauveria* sp.

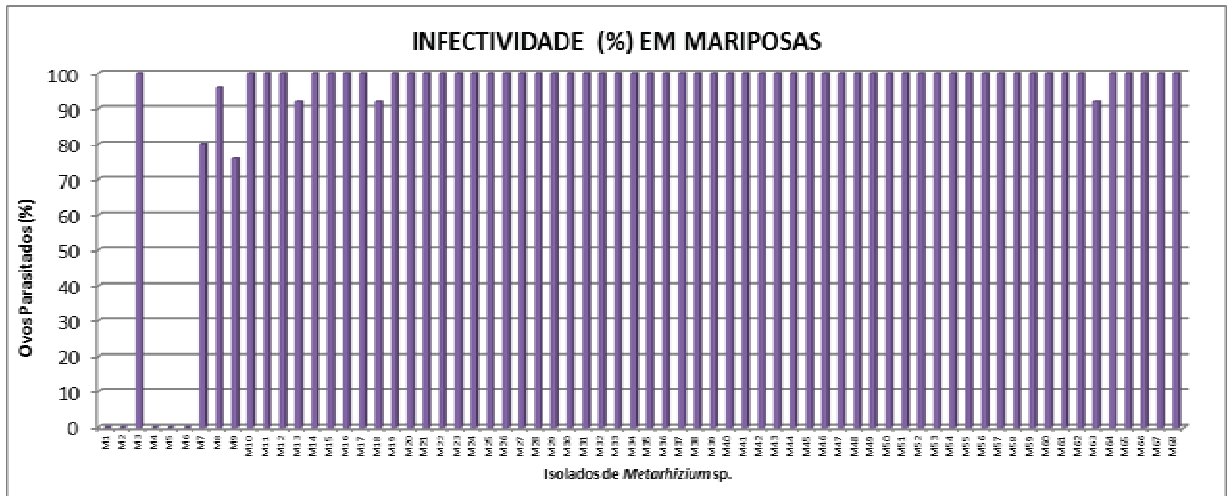


Figura 15. Percentuais de infectividade de diferentes isolados de *Metarhizium* sp. adultos de *D. saccharalis* por Experimento realizado sob condições controladas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em torno de 70 a 80%.

3.3 Avaliação da virulência de isolados de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. sobre ovos, lagartas, crisálidas e adultos de *Diatraea saccharalis*

Neste trabalho os resultados apontam uma relação entre o potencial de virulência e a origem dos isolados estudados, principalmente para isolados de solos, tanto para *Beauveria* sp. quanto para *Metarhizium* sp. Goettel et al. (1990) supôs que um isolado seria mais patogênico para o hospedeiro do qual ele foi originado, no entanto, os isolados obtidos de *D. saccharalis* no presente estudo apresentaram variados níveis de virulência sobre as diferentes fases do desenvolvimento do próprio hospedeiro e não se destacaram entre os três isolados mais virulentos de *Beauveria* sp. Em relação ao fungo *Metarhizium* sp., não foram obtidos isolados provenientes de *D. saccharalis*. Sendo assim, não foi possível observar este tipo de relação apenas com o hospedeiro. Por outro lado, os isolados de *Metarhizium* sp. que se destacaram mostrando ser mais virulentos para todas as fases do desenvolvimento de *D. saccharalis* possuem a mesma origem, em amostras de solos de canaviais, evidenciando uma estreita relação com o ambiente.

Além disso, uma grande variabilidade em relação à virulência foi detectada entre os diferentes isolados estudados, corroborando com dados obtidos por Zappellini et al. (2010) que ao testar 27 isolados de *Metarhizium* sp. para o controle de lagartas de *D.*

saccharalis obtiveram variação de 54 a 100% na mortalidade confirmada. Fernandes et al. (2006) estudaram a patogenicidade de isolados de *B. bassiana* para larvas não alimentadas de *Rhicephalus (Boophilus) microplus*. Analisando-se os percentuais de parasitismo desse estudo, pode-se verificar que, dos trinta isolados avaliados, sete apresentaram índices entre 90 e 99%. Os autores relacionaram o efeito deletério produzido nesses instares à variabilidade genética das estirpes e constataram que alguns isolados, apesar de patogênicos, não são eficazes, pois, mesmo quando utilizados em altas concentrações, não produziram índices de mortalidade satisfatórios para este inseto.

A broca-da-cana é muito sensível ao *Metarhizium* sp. que é capaz de infectar todas as fases de desenvolvimento do inseto. Neste trabalho, o fungo *Metarhizium* sp. demonstrou ser mais virulento para ovos de *D. saccharalis* do que *Beauveria* sp., pois 64% dos isolados promoveram uma eficiência de infectividade de 100%, enquanto *Beauveria* sp. apenas 11%. De acordo com Pinto (2006), os ovos de *D. saccharalis* são mais suscetíveis ao fungo *M. anisopliae* até três a quatro dias de idade. Valente (2011) em seu estudo obteve resultados de patogenicidade para ovos com o fungo *M. anisopliae* sendo mais virulento para os ovos, destacando-se o isolado URPE-11, o qual proporcionou 100% de infecção nos ovos de *Diatraea flavipennella* com 24, 48 e 72 horas de idade, sendo a CL50 (Concentração Letal) estimada em $2,0 \times 10^5$ conídios/ml. Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida et al. (1984) sobre ovos da broca *D. saccharalis* quando também registraram 100% de infecção para ovos de um e dois dias de idade. O mesmo efeito foi observado para ovos de *Blissus antillus* (Leonard) tratados com *M. anisopliae* na concentração de 5×10^6 conídios/mL (SAMUELS et al., 2002).

A fase larval de *D. saccharalis* é a mais crítica da praga para a cultura de cana-de-açúcar, pois é a fase que ocorre todos os danos à planta e, conseqüentemente, os prejuízos. Sendo assim foi considerado um peso maior para o cálculo da média ponderada de infectividade devido à suma importância de selecionar isolados mais agressivos para esta fase de desenvolvimento da praga. Os resultados para esta fase de desenvolvimento foram satisfatórios, pois foram selecionados três isolados provenientes de solo com porcentagem de parasitismo acima de 90% para o fungo *Metarhizium* sp. Para o fungo *Beauveria* sp. foram selecionados dois isolados com 100%

de parasitismo e cinco isolados com porcentagem de parasitismo acima de 90%, sendo todos provenientes de solos.

Os adultos demonstraram ser mais suscetíveis as infecções tanto por isolados de *Beauveria* sp. quanto por isolados de *Metarhizium* sp., sendo este fato atribuído ao grande estresse sofrido por estes insetos nesta fase durante os bioensaios, por terem sido armazenados em pequenas placas de petri e ficarem se debatendo em um espaço pequeno.

No resultado final de eficiência da infectividade dos isolados obtido através da média ponderada, foram observados 7 isolados de *Metarhizium* sp. com eficiência acima de 90% e apenas três isolados de *Beauveria* sp. com a mesma eficiência, demonstrando que *Metarhizium* sp. de maneira geral foi mais agressivo para *D. saccharalis* em condições de laboratório.

Os resultados do presente estudo demonstraram que ovos, lagartas, crisálidas e adultos de *D. saccharalis* são suscetíveis à infecção de diversos isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. e ainda permite caracterizar patogenicamente diversos isolados desses fungos, comprovando que eles apresentam potencial de controle sobre todas as fases de desenvolvimento deste inseto praga. Atualmente, no Brasil existe uma preferência para utilização de *B. bassiana* em relação a *M. anisopliae* para o controle da *D. saccharalis*. Este fato é devido à alta produção de esporos deste fungo, que é considerada quase o dobro, sendo mais interessante para uso no campo, mesmo que alguns isolados de *M. anisopliae* apresentem eficiência igual ou superior a isolados de *B. bassiana*.

Outro fator importante observado é que estes isolados, além de serem promissores para o controle efetivo desta praga são originários de diferentes regiões geográficas do Brasil, o que potencializa ainda mais o interesse por esses isolados, pois, geralmente, na comercialização de produtos a base de fungos entomopatogênicos, é utilizado um único isolado para todo Brasil. No entanto, genótipos de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. podem reagir de maneira diferente a fatores ambientais.

3.4 Agrupamento por Similaridade

Para melhor visualizar a similaridade dos isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. em relação ao seu potencial de parasitismo foi construído um dendrograma com os dados de agressividade (Figura 16 e 17) a partir de uma análise de agrupamento, obtida a partir das medidas de similaridade baseadas no índice de Jaccard e a medida de distância Euclidiana.

A partir dos dados de agressividade dos isolados de *Metarhizium* sp. sobre diferentes fases de desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* foi possível separá-los em dois grupos principais, sendo o primeiro subdividido em dois grupos com respectivamente 49, 14 e 5 isolados. O grupo “Ia” apresentou a maior média de agressividade 84,37%, variando de 51,2% a 100%. Neste grupo estão os isolados com maiores índices de agressividade para todas as fases do ciclo de desenvolvimento da praga, como M 32, M 50, M 61, M 58, M 59, M 53, M 48 e M 49. No grupo “Ib” a média de agressividade foi de 50,14% variando de 36% a 63,2%. No entanto, este grupo é composto por isolados altamente agressivos para a fase adulta e de pupa com 92,57% e 98%, respectivamente, de agressividade para estas duas fases. Por outro lado, índices baixíssimos de agressividade para ovos (4,28%) e mediano para lagartas (50%).

O grupo “II” apresentou média de agressividade de 46,42%, variando de 33,6% a 54,8%. Este grupo apresentou a menor média de agressividade encontrando-se o isolado com a menor média de parasitismo, o M 2 e ainda todos os isolados que não conseguiram atingir nenhum adulto da praga. Todos os isolados que constituem o grupo “II” são isolados comerciais.

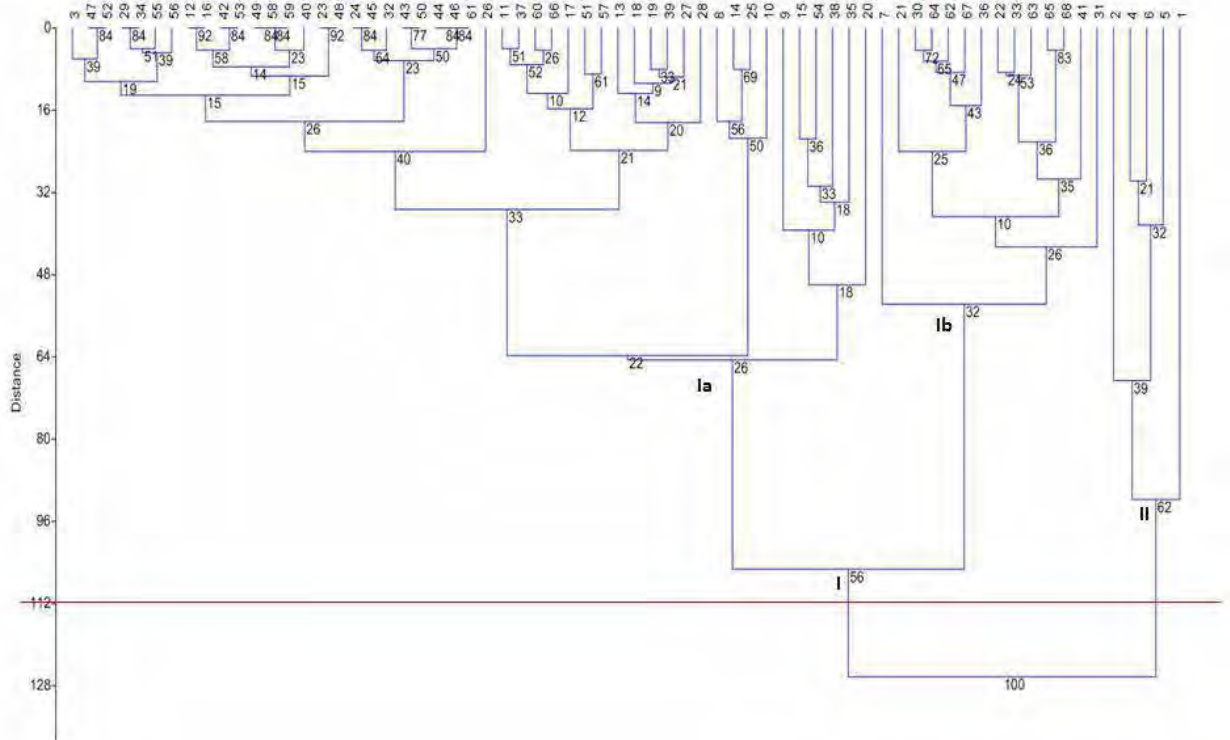


Figura 16. Dendrograma resultante do agrupamento dos dados de agressividade dos isolados de *Metarhizium* sp. através de comparação entre as respectivas distâncias Euclidianas.

Com os dados de agressividade de *Beauveria* sp. foi possível separar os isolados em quatro grupos com respectivamente 29, 5, 4 e 33 isolados. O grupo “I” apresentou a maior média de agressividade para lagartas, 100%, o que quer dizer que conseguiu separar no mesmo grupo todos os isolados mais agressivos para esta fase da praga e ainda para a fase adulta, com 96,55%. Este grupo apresentou uma média de agressividade de 56,64% para todas as fases de desenvolvimento de *Diatraea saccharalis*, variando de 34,4% a 77,2%. Por outro lado, foi o grupo que apresentou o menor índice de agressividade para ovos, com 7,58%. O grupo “II” apresentou média geral de agressividade de 87,36%, variando de 75,6% a 96,8%. Neste grupo estão os isolados com maiores índices de agressividade para todas as fases do ciclo de desenvolvimento da praga, como B 38, B 58 e B 67. No grupo “III” a média de

agressividade foi de 53,75% variando de 38,5% a 70,5%. Os isolados deste grupo possuem índices baixíssimos de agressividade tanto para lagartas com 2% quanto para a fase adulta com 8,5%.

O grupo “IV” apresentou média de agressividade de 35,01%, variando de 13,2% a 58,6%. Este grupo apresentou a menor média de agressividade encontrando-se o isolado com a menor média de parasitismo, o B 27, entretanto, possui média de parasitismo de 71% para lagartas.

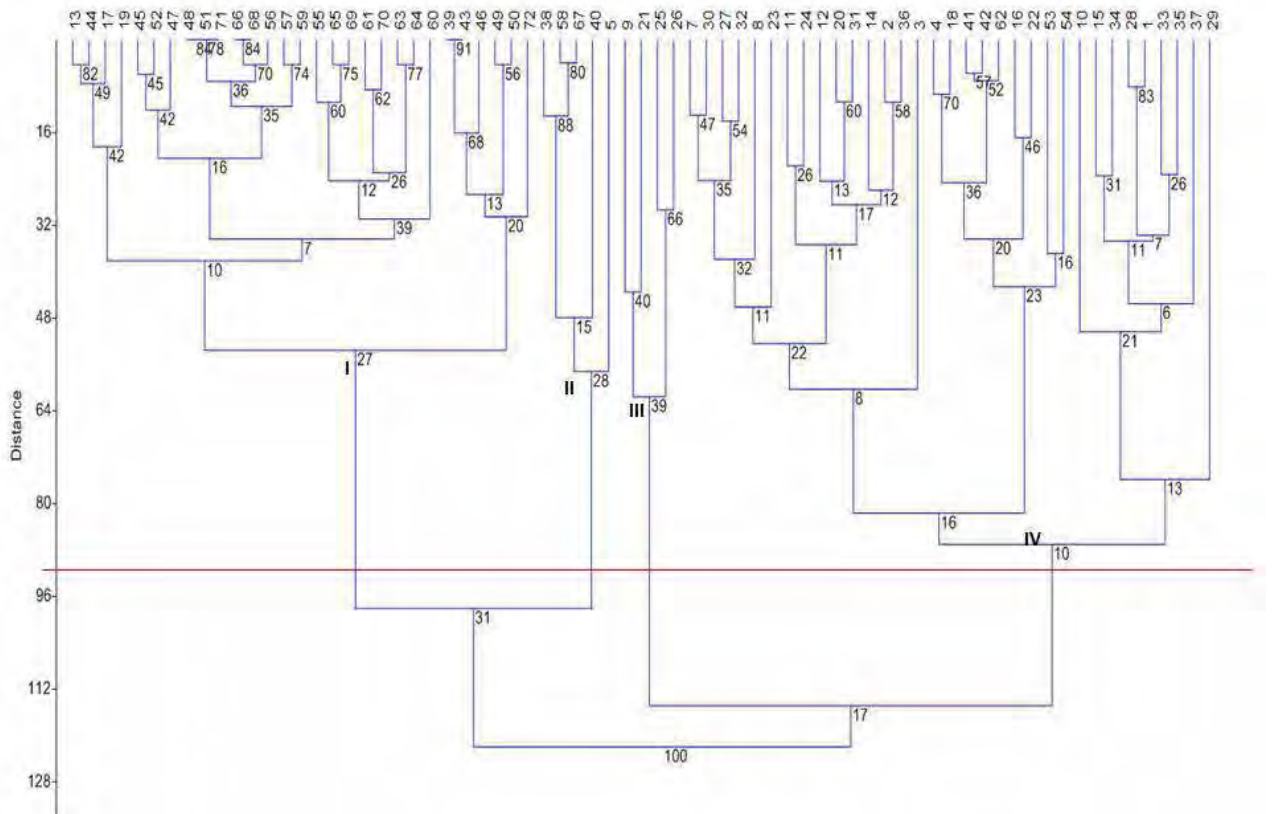


Figura 17. Dendrograma resultante do agrupamento dos dados de agressividade dos isolados de *Beauveria* sp. através de comparação entre as respectivas distâncias Euclidianas.

A utilização de linhagens e/ou isolados apropriados de agentes biológicos é de fundamental importância para o desenvolvimento de um programa de controle microbiano efetivo para uma determinada praga. Para tanto, é imprescindível contar com um bom banco de isolados de diferentes regiões geográficas e hospedeiros,

devidamente preservados e com variabilidade genética comprovada. A partir da seleção dos isolados promissores, devido a grande variabilidade patogênica existente entre os isolados sobre um mesmo hospedeiro e sua especificidade por determinados habitats, deve-se iniciar o programa para otimizar o controle biológico de pragas agrícolas.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Beauveria spp.* E
Metarhizium spp.

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 oito anos depois o mercado de fungos entomopatogênicos demonstrou crescimento significativo no Brasil, fechando o ano de 2006 com um faturamento de aproximadamente US\$ 10 milhões (Alves & Lopes, 2008). Atualmente, somente o Estado de São Paulo foi responsável pela produção de 268 toneladas de bioinseticidas (esporos de fungos entomopatogênicos + veículos), com uma área tratada de 161.910 ha, gerando uma receita de US\$ 1,2 milhões na safra 2002-2003 da cana-de-açúcar. O valor médio do tratamento por hectare foi de aproximadamente US\$ 20 comparado ao custo de US\$ 60 do tratamento com controle químico, gerando diretamente 148 empregos (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2006; ALVES & LOPES, 2008).

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 garantir a sua identidade genética durante o processo produtivo.

Espera-se, assim, que as técnicas moleculares venham concomitantemente de encontro ao controle biológico de pragas, agilizar os processos de identificação de isolados altamente virulentos e promissores ao controle, podendo fornecer, com maior rapidez, mais uma opção ecologicamente correta e menos impactante tanto ao trabalhador rural quanto ao meio ambiente na manutenção de populações de insetos-praga (ZAPPELLINI, 2009). Marcadores moleculares do tipo microssatélites podem ser usados para rastrear o destino de um agente de controle biológico. Eles têm sido utilizados para *Beauveria brongniartii* na Suíça, onde foram amostradas áreas tratadas durante 14 anos após aplicação para avaliar se o agente de controle biológico tinha se estabelecido. Os resultados demonstraram persistência do fungo à longo prazo e que algumas áreas era habitada exclusivamente pela estirpe de *B. brongniartii* aplicada (ENKERLI et al., 2004).

Para avaliar *Beauveria bassiana* e *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. Esses dados não só complementaríamos informações biológicas fundamentais, mas também contribuiríamos em fazer cumprir as exigências para o registro de produtos biológicos (WANG et al., 2003). Além disso, esse tipo de investigação permite uma identificação pontual de isolados favorecendo o desenvolvimento de Sistema de Controle de Identidade Genética de Bioinseticidas e o melhor monitoramento da persistência e do comportamento de um isolado introduzido no ambiente para finalidade de controle de pragas (WANG et al., 2005).

Para atender as necessidades de identificar o perfil genético de cada isolado, o presente estudo teve como objetivo caracterizar molecularmente 72 isolados de *Beauveria* sp. e 68 isolados de *Metarhizium* sp. originários de diversas regiões geográficas, artrópodes hospedeiros ou substratos, analisar a variabilidade genética dos isolados brasileiros de *Beauveria* sp e *Metarhizium* sp. e avaliar a distribuição espacial de genótipos.

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.

A extração de DNA e reações de PCR 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, e a genotipagem dos isolados foram realizadas no Departamento de Tecnologia da UNESP, campus de Jaboticabal – SP.

2.2 Isolados estudados.

Setenta e três isolados de *Beauveria* sp. e sessenta e oito isolados de *Metarhizium* sp. obtidos na etapa de isolamento foram utilizados para este estudo. Os isolados são originários de diversas regiões geográficas brasileiras e de diferentes hospedeiros ou substratos. Essas informações estão disponíveis na Tabelas 2 a 8.

2.3 Extração e Quantificação de DNA

A fim de se obter quantidades suficientes de micélio para a extração de DNA, os isolados de *Beauveria* sp. e *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 com temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm 2$, e fotoperíodo de 12h. 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 gentilmente agitados a cada 10 minutos. 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. Em seguida as amostras foram centrifugadas a $15.294 \times g$ por 10 minutos, a 15°C , o sobrenadante foi transferido para tubos novos, sendo acrescentado a estes 700 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução foi misturada por inversão durante dois minutos e centrifugou-se novamente a $15.294 \times g$ 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 a -20°C “overnight”.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 15.294 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 a vácuo (Eppendorf) a 30°C por 5 minutos. Posteriormente, o “pellet” foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) por 24 horas a 4°C. A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-100 (Uniscience), medindo-se a absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). A relação da absorbância 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 Reação de PCR

Para otimização de temperatura e pareamento dos *primers* SSRs (Sequências Simples Repetidas), foram utilizadas cinco amostras de DNA escolhidas aleatoriamente e empregadas em reações PCR-SSR, com o intuito identificar-se a temperatura ideal de pareamento dos *primers* SSR. A amplificação dos locos SSRs foi realizada a partir de uma reação geral descrita a seguir: 10µL de reação contendo 10ng DNA genômico, 200

μM de cada dNTP, Taq DNA pol (JumpStart REady Mix Taq - Sigma), 0,40 μM de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e água ultrapura estéril.

Nesse teste empregou-se inicialmente as condições de amplificação proposta por Caetano et al. (2005). Para amplificação dos alelos utilizou-se termocicladores 9600 e 9700 Applied Biosystem, com blocos para placas de 96 poços, opção para Gradiente, com o seguinte programa: Lid de 105°C, Gradiente de 5°C (para cima e para baixo) um ciclo de 94°C por 2 min., 40 ciclos de 94°C por 30 seg., 60°C por 1min, 72°C por 30 seg., e um ciclo final de 72°C por 7 min e hold a 4°C. Para cada *primer*, foram testadas 12 temperaturas de pareamento, a saber: 54°C, 54,2°C, 54,7°C, 55,6°C, 56,8°C, 58,1°C, 59,5°C, 60,8°C, 62,1°C, 63,2°C, 64°C, 64,4°C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, em TEB 1X, com corrente elétrica constante de 60V por cerca de três horas. As temperaturas que produziram bandas robustas e sem ocorrência de artefatos foram escolhidas para as amplificações posteriores que serão descritas a seguir:

A amplificação dos locos SSRs, com as temperaturas selecionadas nas etapas anteriores foram realizadas a partir de uma reação geral descrita a seguir: 6 μL de reação contendo 10ng DNA genômico, 200 μM de cada dNTP, Taq DNA pol (JumpStart Ready Mix Taq - Sigma), 0,20 μM 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 (Tabelas 14 e 15). 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.

Tabela 15 - Primers microsatellite de *Beauveria bassiana*: locus identificados (GenBank accession number), padrão de repetição, sequências dos primers forward (F) e reverse (R), tamanhos de alelos clonados (tamanho do intervalo observado entre diferentes espécies; número de alelos observados) em bp (REHNER & BUCKLEY, 2003).

Locus Repeat GenBank Accession Nº.	motif Primer	sequences (5'-3')	Size of cloned allele (no. of alleles; size range) in bp
Ba01 (AY212020)	(CA)14	F: CCAACCCAATCAATCGTCAT R: GAGAGGCGGAGCTAAGCA	103 (4; 100–120)
Ba02 (AY212021)	(CA)20	F: AACGCTATGCCTTGACGAC R: GACGCCGAGCAATGTAACA	140 (10; 110–160)
Ba03 (AY212022)	(CA)26	F: GCATAGATATGTCTCGCACC R: ACTACCCTGTCCCGCTGA	146 (5; 120–160)
Ba05 (AY212023)	(GAT)15	F: AGGCAATACCGAGGTTGGC R: ATCCATGGCGAGCCGTCC	160 (5; 110–175)
Ba06 (AY212024)	(GTT)10	F: GCGATTGACGAAAAGCTAGA R: ACTTGCTTTGCTGTTGCACA	114 (7; 105–125)
Ba08 (AY212025)	(AAG)10	F: TGTTGCCGACACGAATTGT R: GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA	210 (8; 200–250)
Ba12 (AY212026)	(CTT)7	F: GGGTCCATCATGTACGGC R: AGGCGTATACAGGTCGTG	231 (8; 200–240)
Ba13 (AY212027)	(AAG)9	F: CAGGCAACAACACGATTTCA R: ATGCCATCTACGACTTTATGA	161 (5; 140–170)

Tabela 16 - Sequência dos Primers microsattelites e características dos 14 locos de microsattelites de *Metarhizium anisopliae* (FREED et al., 2010).

Locus *	GenBank Accession no.	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Size of cloned allele in bp (no. of alleles, size range)	HE
Ma097	AY842937	(CA)3A(AC)4(A)8	F: AGGAAGTCAAATAGAATACGTACCG R: CCTTTTGTGCGTTGCTTG	44	168 (3, 158-175)	0.265
Ma099	AY842938	(CA)12	F: CAAGTTTACGCATATTGGTTACGATA R: TCACCGGCCATCTCATTAGAT	56	161 (3, 148-152)	0.585
Ma142	AY842939	(CA)8(CGC)5	F: GACGGTATATTTATGATCAGCTCG R: TCGGGAAGTACTTTAAGTATCAC	56	111 (5, 104-128)	0.694
Ma145	AY842940	(A)14/(AC)6(AT)3	F: CCGTACTTGGTACATATTCCTGATG R: GGGATGTCCGCATTTCGAA	56	111 (7, 109-119)	0.801
Ma164	AY842941	(CA)9(ACACA)5	F: GCACTCAACCAAGAGCGAGG R: CAACGTCACCTGTGGCACAC	56	137 (3, 105-119)	0.427
Ma165	AY842942	(CA)4	F: CGACATTTACCGTTGTACATATG R: GGACTGGGAGTTTGGAGCTC	56	139 (4, 126-143)	0.469
Ma195	AY842943	(CA)16	F: AATTATAAACTGAAGAAACAGAAA R: GTGTTCTAGTGACCTCCTTACT	44	124 (4, (101-120)	0.581
Ma210	AY842944	(CA)17	F: CCCGAGGCCTGTAGTCTACG R: TTTCTGGAAGGCAAGAAGCTT	50	121 (5, 95-147)	0.639
Ma307	AY842945	(AGG)3CTG(AAG)2GAG(AAG)4(AGG)3	F: CATGCTCCGCCTTATTCCTC R: GGGTGGCGAAGAAGTAGACG	56	153 (5, 153-199)	0.669
Ma325	AY842946	(A)8G(A)10/(TG)12	F: TTTATTGTGGTTGGAGATGCCA R: CATGATAAAAGGTCATGTTTGCC	50	154 (8, 145-169)	0.808
Ma327	AY842947	(ACACAT)2(AC)4/(A)7G(GAA)3AAGA (AG)5/(AAG)3AG(AAG)2	F: ATAAAGACCAACTCAAAGGACAGGA R: GCATGGACGGCTCTCTAATTATAAC	56	150 (3, 132-159)	0.392
Ma375	AY842948	AY842948 (AAG)2(GAAAAGAAG)2	F: GCATCATCGACGACGACATTA R: TTACGATGGCAACGATGCA	56	150 (3, 132-159)	0.392
Ma416	AY842949	(AAGAG)2/(GAA)2(AAGAG)4(AAG)2	F: GTCAGTAGCTGCAAATCCTTGAG R: AATTAAGGGAGAGAGGCGAAG	50	132 (3, 117-132)	0.309
Ma417	AY842950	(AGG)3/(AAG)2AG(AAG)3	F: TTGTTCCATTCGTCTCATCGG R: AGTCGGAATCAGAGCCAGAAGTA	56	258 (2, 258-261)	0.506

3.3.4 Caracterização e Genotipagem dos Microssatélites

A caracterização dos locos microssatélites foi realizada com 8 marcadores SSR polimórficos para cada espécie estudada. Estes locos selecionados foram utilizados para a genotipagem dos fungos visando a caracterização genética de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp.

As reações de PCR foram realizadas separadas para cada loco. 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 (Figura 18) 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 diversidade genética de um determinado loco marcador corresponde à probabilidade de ocorrência de polimorfismo entre indivíduos tomados ao acaso (RAFALSKY et al., 1996) e é caracterizada por diversos índices como: heterozigosidade esperada, heterozigosidade observada e diversidade alélica, número total de alelos (\hat{A}) e número médio de alelos (\hat{A}).

O Programa Arlequin software 3,01 (EXCOFFIER et al. de 2005).foi utilizado para calcular o número de alelos por loco e o perfil alélico baseado em análises SSRs. Utilizando ainda o mesmo programa, a Análise de Variância Molecular (AMOVA) e índice de fixação F (st) foram calculados para clarificar os padrões moleculares de variação dentro da população de isolados de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp coletados

a partir de diferentes localizações geográficas. O programa Arlequin identificou também a frequência de haplótipos em cada população (grupo).

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. O valor cofenético também foi calculado através do programa PAST, com o objetivo de estimar quanto da matriz original foi explicada pelo dendrograma obtido. Foi feito também uma análise de componentes principais utilizando o programa PCA.

Foi utilizado o programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) a fim de definir o número de grupos (K) mais provável nas amostras, através de métodos bayesianos, não necessitando de informações hierárquicas a priori para definir os grupos de indivíduos geneticamente relacionados com o objetivo de visualizar a estrutura genética da população de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp.

A determinação do número K mais provável em relação aos propostos foi realizada utilizando valores de ΔK , segundo Evanno et al. (2005).

O programa LIAN, versão 3 (HAUBOLD e HUDSON, 2000), foi usado para calcular a diversidade genética média (H) de cada grupo.

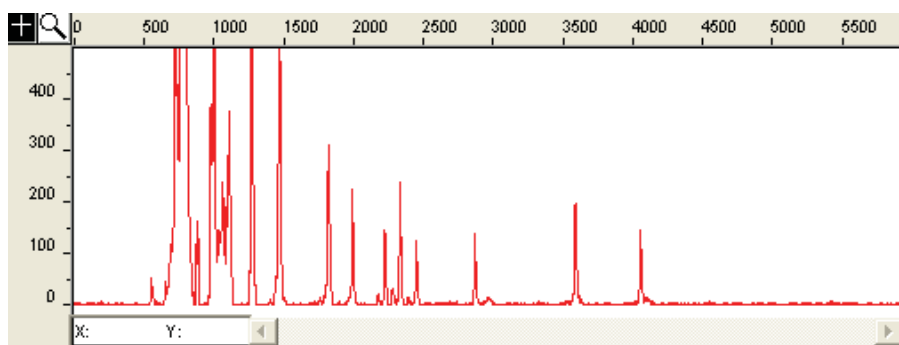


Figura 18 - Eletroferograma do padrão de peso molecular, marcado com ROX e empregado em cada amostra para os cálculos de tamanho alélico em pares de bases (pb). O eixo Y indica a intensidade do sinal de fluorescência e o eixo X número da varredura a laser em que se captou o sinal.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Beauveria* sp.

3.1.1. Frequência e distribuição de alelos em *Beauveria* sp.

Todos os oito marcadores SSRs analisados pelo presente estudo revelaram padrões de picos gerados pelo software ABI Prism Genotyper versão 2.0 NT (Applied Biosystems) típicos de microssatélites, com um pico dominante principal e 1 a 3 picos gagueira fracos, exceto para alguns locos que apresentaram padrões combinados com ou sem excesso, causado pela TaqDNA polimerase conforme observado na Figura 19.

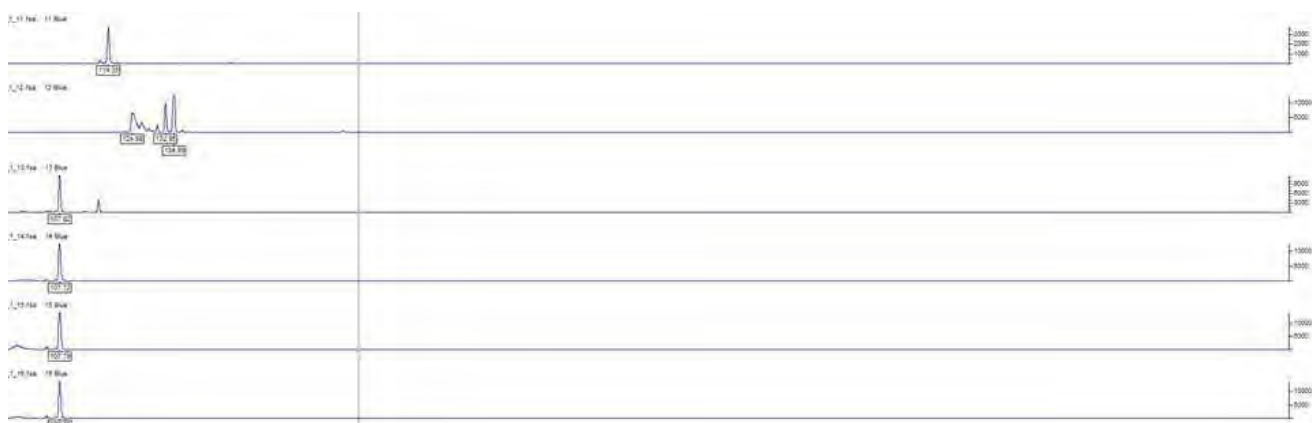


Figura 19. Loco Ba 02 e seus padrões de picos gerados pelo software ABI Prism Genotyper versão 2.0 NT (Applied Biosystems) típicos de microssatélites.

Como ilustra a Figura 20, os oito locos analisados apresentaram polimorfismo para *Beauveria* sp., produzindo um total de 36 alelos na população com 72 isolados do fungo. Considera-se um loco polimórfico quando o alelo mais comum tem frequência inferior a 0,95 (ALFENAS, 1998). Os locos Ba 01, Ba 02, Ba 08, Ba 12 e Ba 13 apresentaram o maior número de alelos, igual a 5 e o loco Ba 03, apresentou o menor número de alelos, com 3 alelos apenas. O número médio de alelos por loco de *Beauveria* sp. foi de 4,5.

Do total de alelos encontrados, 14 (38,88%) apresentaram frequência menor que 0,05 (um alelo nos locos Ba 03, Ba 05 e Ba 06; dois alelos nos locos Ba 01, Ba 02, Ba

12 e Ba 13 e; três alelos no loco Ba 08), sendo estes denominados alelos raros (Figura 20). Os outros 24 alelos apresentaram frequência variando de 0,06 a 0,90.

3.1.2. Agrupamento dos isolados de *Beauveria* sp.

Para a análise da diversidade sem hierarquização, empregando a abordagem bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE 2.3, foram testados 12 arquivos de parâmetros contendo valores de $k=1$ à $k=12$ com 5 corridas para cada valor de K , admitindo um valor sem mistura (pois as amostras de uma população são isoladas das outras), frequências alélicas correlacionadas, 100.000 “burnins” e 200.000 simulações de Monte Carlo de cadeias de Markov (MCMC). A seleção do número K mais provável foi realizada através dos valores de ΔK , de acordo com o método proposto por EVANNO et al. (2005). De acordo com a Figura 21, o valor de k ideal foi igual a 2. No entanto, apenas dois grupos proporcionaram um agrupamento muito generalizado dos isolados e, portanto, foi gerada uma análise com valor de $k=6$.

No gráfico gerado pelo programa STRUCTURE 2.3 (Figura 22), seis grupos de isolados foram formados: grupo azul, rosa, amarelo, vermelho, verde e azul claro. De acordo com a tabela 17, 22 isolados (30,55% = isolados 4, 5, 10, 34, 35, 38, 39, 41, 45, 46, 49, 50, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 62, 66 e 69), três (4,16% = isolados 20, 21 e 22), 15 (20,83% = isolados 1, 7, 8, 11, 15, 17, 18, 24, 27, 28, 29, 44, 55, 63 e 64), sete (9,72% = isolados 2, 14, 25, 26, 37, 67 e 70), quatro (5,55% = isolados 3, 31, 33 e 47) e cinco (6,94% = isolados 19, 30, 60, 68 e 71) isolados foram agrupados no grupo azul, rosa, amarelo, vermelho, verde e azul claro, respectivamente. Sendo assim, através do gráfico gerado pelo STRUCTURE 2.3, foi possível separar 80,55% dos isolados, sendo que os outros 19,44%, 16 isolados, apresentaram misturas de cores e, para eles, foram criados mais cinco grupos separados. O sétimo grupo foi constituído por cinco isolados (12, 13, 36, 48 e 61), o oitavo por dois (72 e 73), o nono por cinco (9, 32, 40, 42 e 65), o décimo e décimo primeiro por dois (43 e 51), (16 e 23) respectivamente, por estes apresentarem padrões de cores muito semelhantes entre si.

O grupo 1 é um grupo muito variado, composto por isolados obtidos de solos de diferentes regiões geográficas e diferentes culturas, como cana-de-açúcar, soja, sorgo, milho e feijão. Os isolados B3, B34, B35, B38, B41, B54, B57 e B66; B5, B10, B39, B45,

B46, B59, B62 e B69 e ainda B52 e B58, pertencentes a três haplotipos, respectivamente, são tão semelhantes (distância genética igual a zero) que foram geneticamente indênticos para os locos amostrados. O segundo grupo é formado por isolados originários de um mesmo hospedeiro, carrapatos (*Acari: Ixodidae*) e localidade, pois todos os insetos são do Estado do Rio de Janeiro.

O terceiro grupo é formado por isolados provenientes de hospedeiros como *Diatraea saccharalis* e *Sphenophorus levis*, solos de cana-de-açúcar, milho e sorgo e ainda dois isolados do Instituto Biológico e um isolado comercial. Também foram observados para este grupo, isolados geneticamente idênticos para os locos amostrados, incluindo B7, B11, B15, B17, B24, B27, B28, B29, B63 e B64; B8, B18, B1, B44 e B55, sendo este segundo subgrupo formado por isolados de diversas localidades, o que sugere que estes isolados sejam oriundos de um ancestral comum, dois isolados do Instituto Biológico, B28 e B29. O quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, nono e décimo grupo são grupos bem mistos, sendo formados sempre por representantes de isolados comerciais, isolados do Instituto Biológico, de solo de canaviais, milho e soja e hospedeiros como *Solenopsis invicta*, *Diatraea saccharalis* e *Sphenophorus levis* de diferentes localidades. O grupo 11 é composto por dois isolados, um proveniente do inseto *D. saccharalis* e o outro de Carrapato *Boophilus microplus*. Estes resultados corroboram com Berreta et al (1998), quando detectaram a diversidade e alta similaridade genética entre amostras de *B. bassiana* da Argentina e do Brasil isoladas de espécies de hospedeiros diferentes. Glare e Inwood (1998), também puderam observar que isolados de *B. bassiana* de diferentes regiões e espécies podem ser reunidos em um mesmo grupo genético.

Foi também 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 23) permite visualizar a similaridade genética e separação dos isolados de *Beauveria* sp, bem como a correspondência entre a análise pelo método aglomerativo (resulta no dendrograma) com o teste de atribuição (Structure). O valor de correlação cofenética $r = 0,9076$ indica que o dendrograma é pertinente, sendo os 72 isolados agrupados em quatro grupos divergentes:

- I. Isolados 20, 21 e 22.
- II. Isolados 4, 34, 35, 38, 41, 54, 57, 66, 5, 10, 39, 45, 46, 59, 62, 69, 56, 50, 52, 58, 49, 53, 43, 72, 73, 16, 23, 30, 51, 19, 71, 60, 68 e 36.
- III. Isolados 7, 11, 15, 17, 24, 27, 28, 29, 63, 64, 42, 32, 9, 65, 8, 18, 1, 44, 55, 12, 37, 14, 26, 13, 70, 25, 67, 61, 2, 48 e 40.
- IV. Isolados 3, 33, 47 e 31.

A representação da similaridade também pode ser observada na análise do gráfico de dispersão (Figura 24), sendo feita com todos os isolados para facilitar a visualização em três dimensões da estruturação observada nas amostras. Essa análise mostra claramente a formação de 11 grupos, assim como definido pelo programa STRUCTURE, confirmando o agrupamento de isolados com haplótipos mistos em grupos distintos conforme o padrão de cores.

3.1.3. Variabilidade e Diversidade Genética de *Beauveria* sp.

Para estudar a diversidade genética foram utilizados os 11 grupos de *Beauveria* sp. formados com auxílio do STRUCTURE 2.3. De acordo com a Tabela 18, os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) indicam que 74,69% da variabilidade genética total foi explicada pela variação entre os grupos, enquanto a variância dentro dos grupos foi responsável por apenas 25,31%. O índice de fixação (F_{st}) foi igual a 0,74, indicando que houve elevada variabilidade genética entre os isolados de *Beauveria* sp., principalmente entre os grupos formados. No caso do presente estudo, a menor variabilidade entre os grupos pode ser atribuída ao fato de a AMOVA ter sido feita posteriormente à formação desses grupos com base na análise dos gráficos gerados pelo STRUCTURE. Estudos futuros são necessários para fazer a

Considerando os 72 isolados, a diversidade genética média (H) entre os locos foi de 0,2418, variando de 0,0278 a 0,5067 entre os 36 alelos obtidos (Tabela 17). Resultados semelhantes foram obtidos por Wang et al. (2005) estudando a diversidade genética e estrutura de diversas populações de *B. bassiana* da China, com 0,25 de índices de diversidade genética, indicando alta diversidade genética nas populações. Já a diversidade genética para cada um dos onze grupos formados pelo STRUCTURE

variou de 0,0302 a 0,1944 (Tabela 18). A menor diversidade genética foi encontrada nos grupos 1 e 3 com H igual 0,0452 e 0,0302, respectivamente. Essa baixa diversidade genética encontrada pode ser atribuída ao fato de que estes grupos possuem haplotipos dominantes, com um número elevado de indivíduos compartilhando os mesmos alelos, mesmo sendo constituídos por isolados de diferentes localidades. No grupo 3, por exemplo, apesar de os isolados serem provenientes de solos de diversas culturas e de diferentes hospedeiros são 100% similares aos isolados do Instituto Biológico (B28 e B29), que além de possuírem coleções de isolados para pesquisa também transferem alguns isolados para comercialização. Por outro lado, os grupos 7 e 10 foram os mais diversos com H igual a 0,1833 e 0,1944, respectivamente. O grupo 7 é um grupo formado por isolados oriundos de solo de canaviais, com exceção de um isolado o B12, que mesmo pertencendo a este grupo é oriundo do hospedeiro *D. saccharalis*, podendo ser atribuída a maior diversidade genética encontrada para o mesmo. Já o grupo 10 é um grupo formado por apenas dois isolados provenientes de solos de canaviais, no entanto um pertence ao Estado de São Paulo e outro do Estado de Goiás.

3.1.3. Estrutura Populacional de *Beauveria* sp.

A partir dos oito locos utilizados, foram identificados 42 haplotipos dentre os 72 isolados estudados (Figura 25). sendo que o grupo 1 apresentou o maior número de haplotipos igual a 8 e o grupo 8 foi constituído por apenas um isolado (Figura 26). A similaridade entre os haplotipos obtidos variou entre 3 e 100%. Os haplotipos 1.2 e 1.3 (Grupo 1. Haplotipo 2 e 3), e 3.2 e 3.3 (Grupo 3. Haplotipo 2 e 3) foram altamente abundantes com frequência de 0,36 e 0,32, e 0,67 em seus respectivos grupos, ou seja, para os haplotipos 1.2 e 1.3, e 2.2 e 2.3 foram identificados 7 e 8 e 10 e 4 isolados, respectivamente. Portanto, 40,27% (29 isolados) do total de 72 isolados estudados pertencem a apenas quatro haplotipos. No presente estudo, o haplotipo dominante 1.2 pode ser representado pelo isolados B34 e 35, 50% de cada, que originalmente são isolados da coleção do Instituto Biológico e foram obtidos de solos de canaviais de Assis-SP. A dominância desse haplotipo pode possivelmente ser atribuída ao fato de que grande parte dos isolados foram obtidos de solos de cultivo com a cana-de-açúcar.

Como o Instituto Biológico, além manter uma coleção ampla de *Beauveria* sp. para pesquisas, fornece isolados como matrizes para a produção comercial de *Beauveria*, pode-se dizer que esses isolados têm como ancestral comum os isolados IBCB 597 e IBCB 598 pós-produção comercial. O haplotipo 1.3 também pode ser representado com estes dois isolados, pois geneticamente pertencem ao mesmo grupo.

A dominância do haplotipo 3.2, também pode ser representado por isolados do Instituto Biológico, como B29 e B29, que originalmente são IBCB 215 e IBCB 278, obtidos de solos de canaviais da região de Ribeirão Preto-SP. O haplotipo 3.2 tem como representante o isolado B1. O isolado B1 foi isolado de arroz com esporos do fungo fornecido pela empresa Biocana. Os isolados B44, e M55 foram isolados de solos cultivados com cana-de-açúcar em Morrinho-GO e Barra Bonita-SP, respectivamente. O isolado B8 é proveniente de lagartas de *D. saccharalis* coletadas em áreas de cana-de-açúcar infestada com esta praga da região de Lucélia-SP e o isolado B18 de solos da cultura de milho de Maracajú-MS. Essas áreas de cultivo de cana-de-açúcar e milho em algum momento anterior à coleta da amostra, podem ter sido provavelmente pulverizadas com esporos de *Beauveria* sp. advindos de laboratórios comerciais que utilizam os isolados do Instituto Biológico como matriz, pois os dois haplotipos pertencem ao mesmo grupo.

Os isolados B20, B21 e B22 respectivamente, haplotipo 2.1, 2.2 e 2.3, provenientes de carrapatos (*Acari: Ixodidae*) do Estado do Rio de Janeiro, ao contrário do observado em *Metarhizium* sp, não pertencem ao mesmo haplotipo. Apesar de estarem todos reunidos no Grupo 2 pelo STRUCTURE e apresentarem especificidade de *Beauveria* sp. ao inseto hospedeiro carrapatos (*Acari: Ixodidae*), nenhum deles pertence ao mesmo haplotipo, indicando variabilidade em relação ao um mesmo hospedeiro. Tal fato por ser explicado pelo elevado grau de variabilidade genética exibida pelos fungos entomopatogênicos, pois dentro de uma determinada população, o nível de polimorfismo entre os isolados pode ser altamente variável (SOSA-GÓMEZ et al., 2006). Através da técnica de microssatélites utilizada no presente estudo, foi possível a identificação de 33 (46% do total de isolados) (Figura 26) haplótipos com apenas um isolado, variando de 1 a 5 dentro dos grupos, indicando, portanto, a existência de ampla diversidade genética em escala regional e sobre o mesmo

hospedeiro. A variabilidade genética está fortemente presente entre os isolados de *Beauveria* sp. e aspectos como reprodução, estratégias de sobrevivência, diversidade de hospedeiros e mecanismo de dispersão são fatores capazes interferir na estrutura genética da população de um agente entomopatogênico, promovendo estas variações (OLIVEIRA, et al., 2011).

3.1.4. Correlação entre Distância Genética e Patogenicidade dos isolados de *Beauveria* sp.

Foram realizadas análises de correlação entre a distância genética e agressividade dos isolados de *Beauveria* sp. Os dados de correlação foram obtidos através de comparação entre as respectivas distâncias Euclidianas utilizando o Teste de Mantel (estatística de teste de correlação entre duas matrizes) no programa PAST com 5.000 permutações.

Os resultados de Correlação $R = 0,06419$ e P valor associado = $0,0134$ (significativo $< 0,05$) demonstram que houve correlação da agressividade com a distância genética dos isolados, bem como a relação dos agrupamentos no dendrograma.

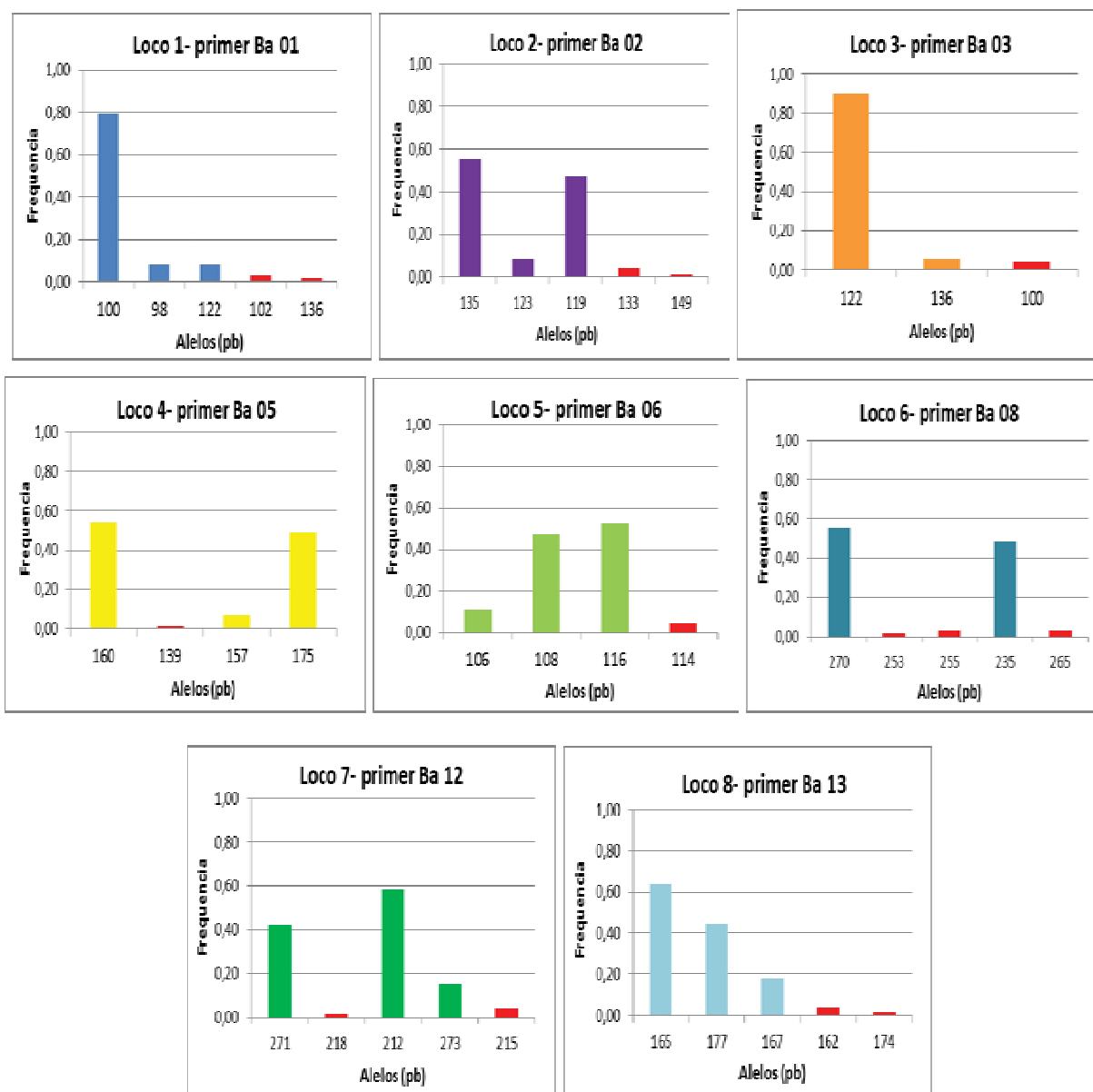


Figura 20. Histogramas das frequências alélicas dos oito locos de SSR, estimados para todos os isolados de *Beauveria* sp. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o tamanho do alelo. Barras na cor vermelha indicam alelos raros (frequência menor que 0,05).

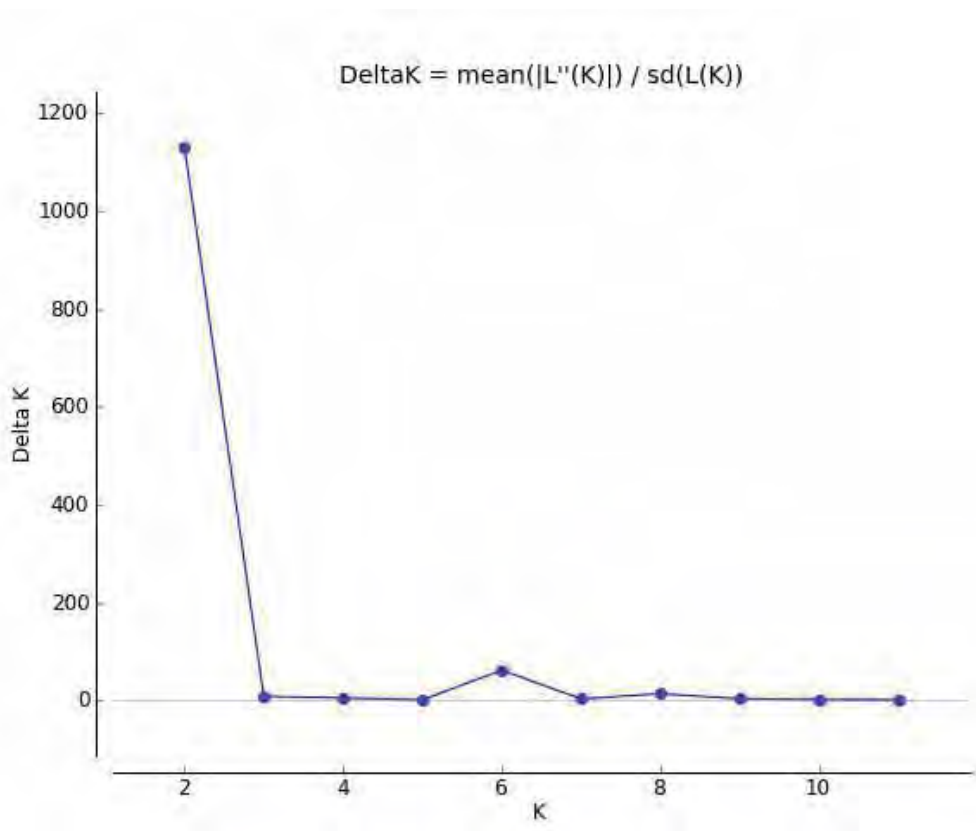


Figura 21. Valores de ΔK para para cada valor de K calculado para os isolados do fungo *Beauveria* sp., de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005). O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo.

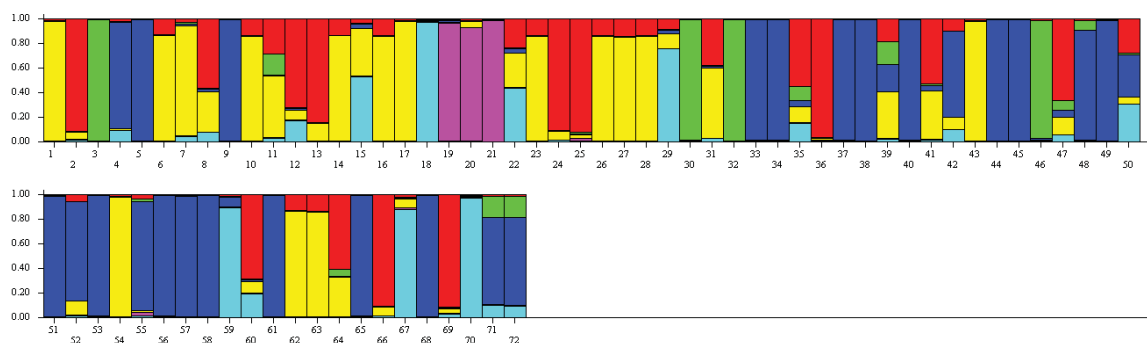


Figura 22. Teste de atribuição para os isolados do fungo *Beauveria* sp. (K=6). Isolados representados pelas barras verticais coloridas. A mesma cor em isolados diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indica a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. Para a identificação dos isolados (Tabela X). O eixo das coordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo (Q).

Tabela 17 – Grupo de isolados formados pelo programa STRUCTURE 2.3.

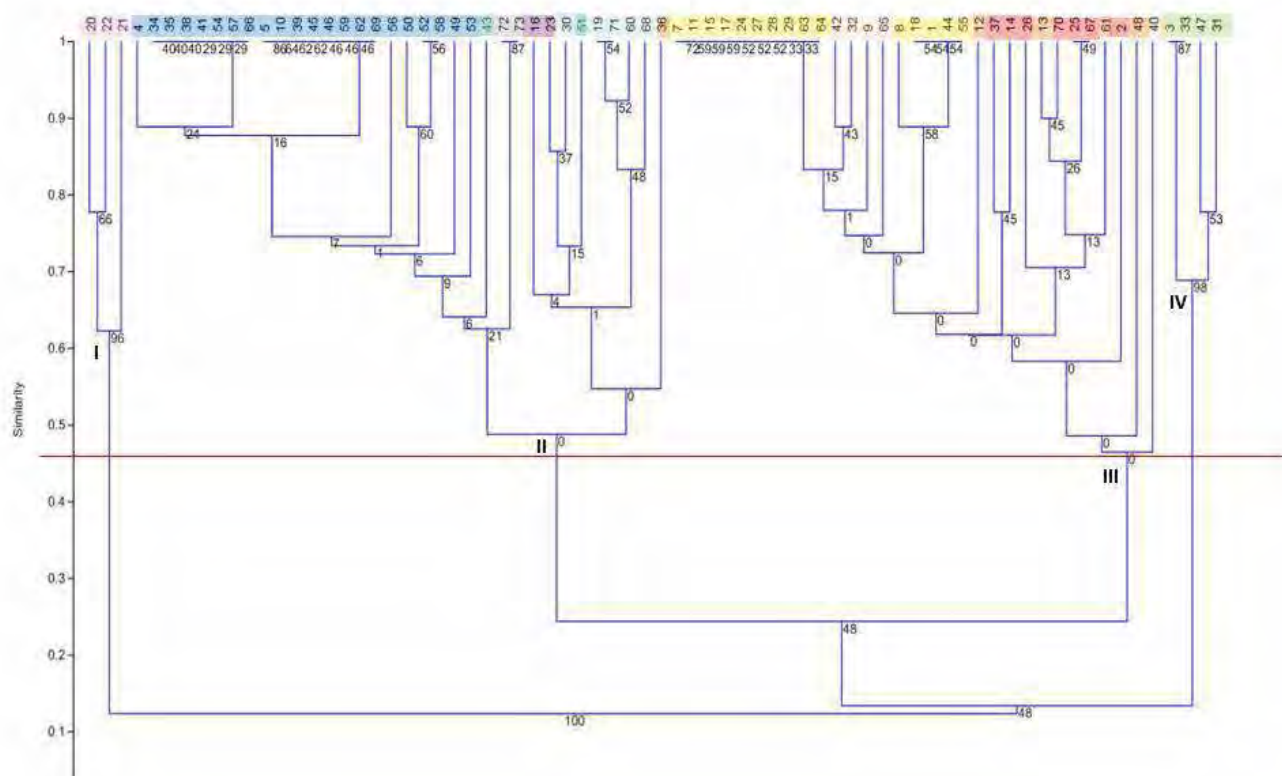
GRUPO 1								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MÉDIA DO PARASITISMO (%)
B 5	USINA MANDÚ	Solo- Canaviais	Guaira- SP	100	96	100	40	75,6
B 10	FAZENDA SÃO JUDAS	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	100	14	92	0	49,8
B 34	IBCB 597- INSTITUTO BIOLÓGICO	Solo- Canaviais	Assis- SP	80	0	68	40	53,6
B 35	IBCB 598- INSTITUTO BIOLÓGICO	Solo- Canaviais	Assis- SP	80	14	72	20	47,8
B 38	USINA SÃO FERNANDO- MS	Solo- Canaviais	Dourados- MS	100	84	100	84	92
B 39	BIURITIALEGRE- GO	Solo- Canaviais	GO	0	96	100	16	36
B 41	USINA CERRADINHO	Solo- Canaviais	Catiguá- SP	0	8	100	60	44,8
B 45	MORRINHO- GO	Solo- Canaviais	Morrinhos- GO	0	96	100	72	58,4
B 46	RONDONÓPOLIS - MT	Solo- Canaviais	Rondonópolis- MT	0	80	100	16	34,4
B 49	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	0	100	100	36	44,4
B 50	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	0	100	100	40	46
B 52	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	Solo- Feijão	Sebastianópolis do Sul- SP	0	100	100	76	60,4
B 53	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	Solo- Feijão	Sebastianópolis do Sul- SP	0	24	100	40	38,4
B 54	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	Solo- Feijão	Sebastianópolis do Sul- SP	0	44	100	68	51,6
B 56	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	0	100	100	60	54
B 57	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	0	100	100	52	50,8
B 58	MACATUBA- SP	Solo- Sorgo	Macatuba- SP	100	80	100	96	96,4
B 59	MACATUBA- SP	Solo- Sorgo	Macatuba- SP	0	100	100	48	49,2
B 62	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	Solo- Milho	Sebastianópolis do Sul- SP	0	0	100	60	44
B 66	GRUPO LDC (DREYFUS)	Solo- Milho	Rio Brilhante- MS	0	100	100	56	52,4
B 69	ITAPORÃ- MS	Solo- Soja	Itaporã- MS	20	100	100	72	64,8
				27,62	68,38	96,76	50,10	54,51
GRUPO 2								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MÉDIA DO PARASITISMO (%)
B 20	UFRJ- Bb46	A cari: Ixodidae	Paracambi- RJ	0	14	64	5	16,2
B 21	UFRJ- Bb02	A cari: Ixodidae	Paracambi- RJ	60	5	0	50	38,5
B 22	UFRJ- LCM 01	A cari: Ixodidae	Seropédica- RJ	0	0	80	60	40
				20,00	6,33	48,00	38,33	31,57

Tabela 17 – Grupo de isolados formados pelo programa STRUCTURE 2.3. (continuação)

GRUPO 3								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MÉDIA DO PARASITISMO (%)
B 1	COMERCIAL 1	Desconhecido	Desconhecido	60	14	72	45	51,8
B 7	FAZENDA SÃO JUDAS	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	40	5	36	10	23,7
B 8	FAZENDA SÃO JUDAS	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	0	0	44	20	16,8
B 11	FAZENDA SÃO JUDAS	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	20	5	72	20	28,9
B 15	FAZENDA SÃO JUDAS	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	100	10	68	35	58,6
B 17	MARACAJÚ- MS	Solo- Milho	Maracajú- MS	0	100	100	92	66,8
B 18	MARACAJÚ- MS	Solo- Milho	Maracajú- MS	0	0	100	88	55,2
B 24	USINA SÃO MARTINHO	<i>Sphenophorus levis</i>	Desconhecido	40	0	68	15	31,6
B 27	USINA SÃO MARTINHO 2	<i>Sphenophorus levis</i>	Desconhecido	20	0	36	0	13,2
B 28	IBCB 215- INSTITUTO BIOLÓGICO	Solo- Canaviais	beirão Preto- S	60	14	80	45	53,4
B 29	IBCB 278- INSTITUTO BIOLÓGICO	Solo- Canaviais	beirão Preto- S	80	71	48	0	40,7
B 44	MORRINHO- GO	Solo- Canaviais	Morrinhos- GO	0	96	100	100	69,6
B 55	USINA DA BARRA (SÍTIO STA HELENA)	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	20	100	100	84	69,6
B 63	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	Solo- Milho	Sebastianópolis do Sul- SP	40	100	100	64	67,6
B 64	BARBOSA- SP	Solo- Sorgo	Barbosa- SP	40	100	100	60	66
				34,67	41,00	74,93	45,20	47,57
GRUPO 4								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MÉDIA DO PARASITISMO (%)
B 2	COMERCIAL 2	Desconhecido	Desconhecido	20	0	80	0	22
B 14	FAZENDA SÃO JUDAS	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	0	0	92	5	20,4
B 25	USINA SÃO MARTINHO	<i>Sphenophorus levis</i>	Desconhecido	80	14	8	85	61
B 26	USINA SÃO MARTINHO 2	<i>Sphenophorus levis</i>	Desconhecido	100	5	0	100	70,5
B 37	COLOMBO - PR	<i>Thelosia camina</i>	Colombo - PR	60	29	100	15	46,9
B 67	GRUPO LDC (DREYFUS)	Solo- Milho	Rio Brilhante- MS	100	84	100	96	96,8
B 70	ITAPORÃ- MS	Solo- Soja	Itaporã- MS	20	100	100	60	60
				54,29	33,14	68,57	51,57	53,94
GRUPO 5								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MÉDIA DO PARASITISMO (%)
B 3	COMERCIAL 3	Desconhecido	Desconhecido	20	57	44	10	24,5
B 31	IBCB 281- INSTITUTO BIOLÓGICO	Solo- Canaviais	Ribeirão Preto- SP	0	5	64	0	13,3
B 33	IBCB 302- INSTITUTO BIOLÓGICO	Solo- Canaviais	Ribeirão Preto- SP	60	10	68	15	38,6
B 47	RONDONÓPOLIS - MT	Solo- Canaviais	Rondonópolis- MT	0	88	100	80	60,8
				20	40	69	26,25	34,30

Tabela 17 – Grupo de isolados formados pelo programa STRUCTURE 2.3. (conclusão)

GRUPO 6								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MEDIA DO PARASITISMO (%)
B 19	MARACAJÚ-MS	Solo- Milho	Maracajú-MS	0	80	100	92	64,8
B 30	IBCB 279- INSTITUTO BIOLÓGICO	Solo- Canaviais	beirão Preto- S	40	0	32	0	18,4
B 60	USINA MONÇÕES- SP	Solo- Canaviais	Monções- SP	40	100	100	88	77,2
B 68	ITAPORÃ- MS	Solo- Milho	Itaporã- MS	0	100	100	56	52,4
B 71	DOURADOS- MS	Solo- Milho	Dourados- MS	0	100	100	64	55,6
				16	76	86,40	60	53,68
GRUPO 7								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MEDIA DO PARASITISMO (%)
B 12	FAZENDA SÃO JUDAS	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	0	24	80	10	22,4
B 13	BARBOSA - SP	Solo- Canaviais	Barbosa- SP	0	96	100	96	68
B 36	IBCB 600- INSTITUTO BIOLÓGICO	Solo- Canaviais	Echaporã- SP	20	10	76	0	22,2
B 48	RONDONÓPOLIS - MT	Solo- Canaviais	Rondonópolis- MT	0	100	100	64	55,6
B 61	USINA MONÇÕES- SP	Solo- Canaviais	Monções- SP	20	100	100	52	56,8
				8	66	91,20	44,40	45
GRUPO 8								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MEDIA DO PARASITISMO (%)
B 72	DOURADOS- MS	Solo- Milho	Dourados- MS	0	72	100	40	43,2
B 73	ESALQ 447	<i>Solenopsis invicta</i> (Hemiptera: Formicidae)	Cuiabá- MT	0	0	100	20	28
				0	36	100	30	35,60
GRUPO 9								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MEDIA DO PARASITISMO (%)
B 9	FAZENDA SÃO JUDAS	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	100	10	0	35	45
B 32	IBCB 300- INSTITUTO BIOLÓGICO	Solo- Canaviais	beirão Preto- S	20	14	36	0	14,6
B 40	BIURITIALEGRE- GO	Solo- Canaviais	Buriti Alegre- GO	60	76	100	76	76
B 42	USINA CERRADINHO	Solo- Canaviais	Catiguá- SP	0	4	100	64	46
B 65	BARBOSA - SP	Solo- Sorgo	Barbosa- SP	20	100	100	76	66,4
				40	40,80	67,20	50,20	49,60
GRUPO 10								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MEDIA DO PARASITISMO (%)
B 43	MORRINHO- GO	Solo- Canaviais	Morrinhos- GO	0	96	100	16	36
B 51	USINA DA BARRA (SEDE)	Solo- Canaviais	Barra Bonita- SP	0	100	100	64	55,6
				0	98	100	40	45,80
GRUPO 11								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MEDIA DO PARASITISMO (%)
B 16	FAZENDA SÃO JUDAS	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lucélia - SP	0	0	68	50	33,6
B 23	UFRJ- Bb 38	<i>Carrapato Boophilus microplus</i>	Paracambi- RJ	20	14	4	30	20,2
				10	7	36	40	26,90



$r=0,9076$

Figura 23. Dendrograma baseado na similaridade de Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA pela análise dos alelos gerados por oito locos SSR de 72 isolados de *Beauveria* sp.. A consistência dos nós foi obtida através de 10.000 reamostragens “bootstrap”. As cores correspondem aos grupos obtidos na análise do Structure. A linha tracejada corresponde à linha imaginária para a separação dos agrupamentos. Algarismos romanos indicam os cinco grupos principais encontrados.

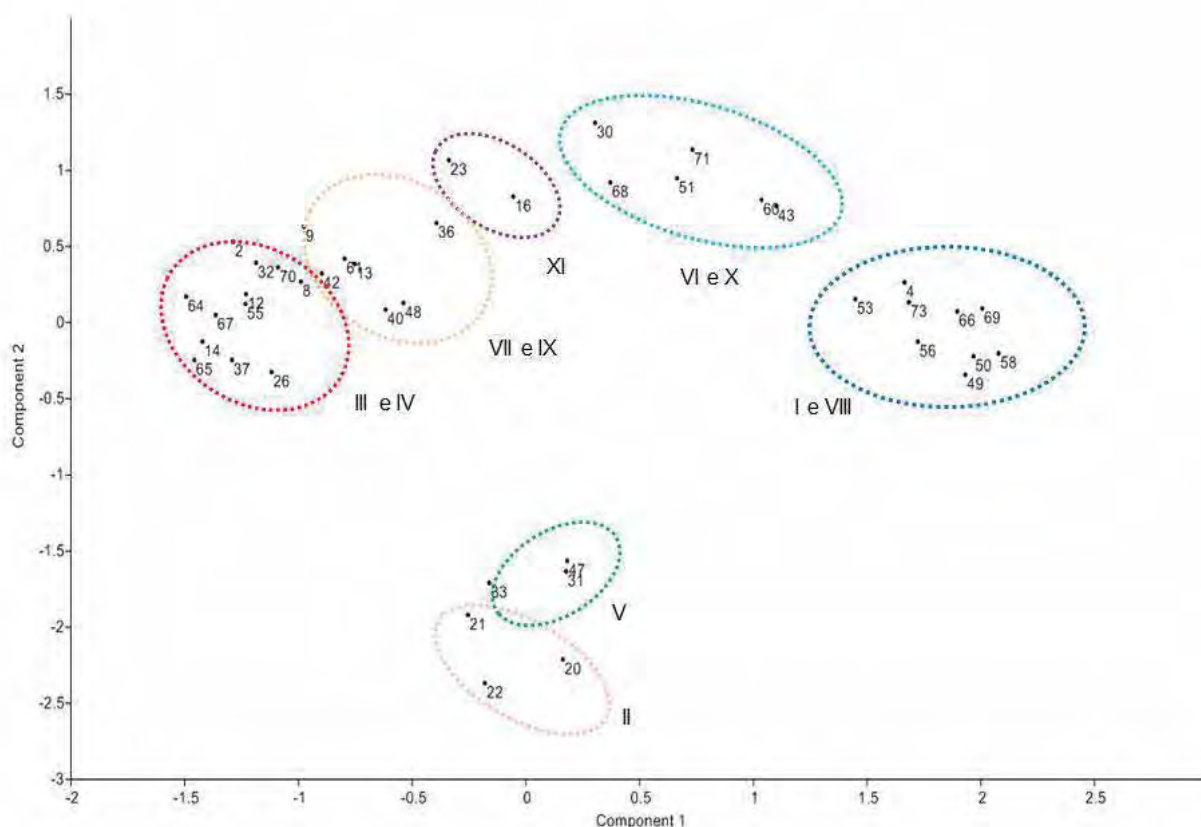


Figura 24. Gráfico de dispersão por coordenadas principais obtido por SSR e similaridade genética dos 68 isolados *Beauveria* sp.

Tabela 18. Análises de Variância Molecular (AMOVA) resultados e índice de fixação (F_{st}^{θ}) de Sequências Simples Repetidas (SSR) de isolados de *Beauveria* sp.

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage variation
SSR				
Among populations	10	232.906	3.67907 Va	74.69
Within populations	61	76.053	1.24677 Vb	25.31
Total	71	308.958	492584	
Fixation Index	Fst	0.74689		

Tabela 19. Sequência dos Primers de Microsatélites e características dos 8 locos de microsatélites de *Beauveria* sp.

Locus Microsatélites de *Beauveria* sp.: locus identificados (Número de acesso do GenBank), motivo de repetição, sequências dos primers forward (F) e reverse (R), temperatura de anelamento, (tamanho do intervalo observado entre diferentes espécies; número de alelos observados) em bp.

Locus Repeat GenBank Accession Nº.	motif Primer	sequences (5'-3')	Annealing temp. (°C)	(nº. of alleles; size range) in bp	He
Ba01 (AY212020)	(CA) ¹⁴	F: CCAACCCAATCAATCGTCAT R: GAGAGGCGGAGCTAAGCA	57,5	(5; 98–136)	0,14
Ba02 (AY212021)	(CA) ²⁰	F: AACGCTATGCCCTTGACGAC R: GACGCCGAGCAATGTAACA	54,2	(5; 117–271)	0,25
Ba03 (AY212022)	(CA) ²⁶	F: GCATAGATATGTCTCGCACC R: ACTACCCTGTCCCCTGTA	57,5	(3; 100–166)	0,12
Ba05 (AY212023)	(GAT) ¹⁵	F: AGGCAATACCGAGGTTGGC R: ATCCATGGCGAGCCGTC	57,5	(4; 128–176)	0,29
Ba06 (AY212024)	(GTT) ¹⁰	F: GCGATTGACGAAAAGCTAGA R: ACTTGCTTTGCTGTTGCACA	64,0	(4; 102–132)	0,32
Ba08 (AY212025)	(AAG) ¹⁰	F: TGTGCGGACACGAAATGT R: GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA	57,5	(5; 135–270)	0,22
Ba12 (AY212026)	(CTT) ⁷	F: GGGTCCATCATGTACGGC R: AGGCGTATACAGGTCGTG	55,4	(5; 212–272)	0,27
Ba13 (AY212027)	(AAG) ⁹	F: CAGGCAACAACACGATTTCA R: ATGCCATCTACGACTTTATGA	57,5	(5; 153–177)	0,27
Mean				4,5	0,2418

Tabela 20. Diversidade Genética por alelos dos grupos de *Beauveria* sp. formados pelo STRUCTURE.

Alelos	Diversidade Genética dos Grupos										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
h1	0.3117	0.6667	0.0000	0.4762	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.4000	1.000	0.0000
h2	0.0909	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	0.5000	0.4000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000
h3	0.2468	0.0000	0.0000	0.4762	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.000	0.0000
h4	0.0000	0.6667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	0.5000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h6	0.0000	0.0000	0.0000	0.2857	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000
h8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h10	0.0000	0.0000	0.0000	0.2857	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h11	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h13	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h14	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000
h15	0.0000	0.0000	0.0000	0.2857	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h16	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000
h17	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000
h18	0.0000	0.6667	0.4762	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	10.000
	Diversidade Genética dos Grupos										

Alelos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
h19	0.0000	0.0000	0.4762	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.000	10.000
h20	0.0000	0.0000	0.0000	0.4762	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000
h21	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h22	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h23	0.0000	0.0000	0.0000	0.2857	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6667	0.6667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h25	0.0000	0.6667	0.0000	0.0000	0.6667	0.6667	0.4000	0.0000	0.0000	1.000	10.000
h26	0.0000	0.6667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h27	0.0909	0.0000	0.0000	0.4762	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000	1.000	0.0000
h28	0.0000	0.0000	0.0000	0.2857	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h29	0.0909	0.0000	0.1333	0.0000	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000
h30	0.0000	0.0000	0.0000	0.4762	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h31	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h32	0.0909	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4000	1.000	0.0000
h33	0.0909	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	10.000
h34	0.5238	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4000	1.000	0.0000
h35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h36	0.0909	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Média	0.0452	0.0926	0.0302	0.1058	0.0648	0.0648	0.1833	0	0.1333	0.1944	0.1111

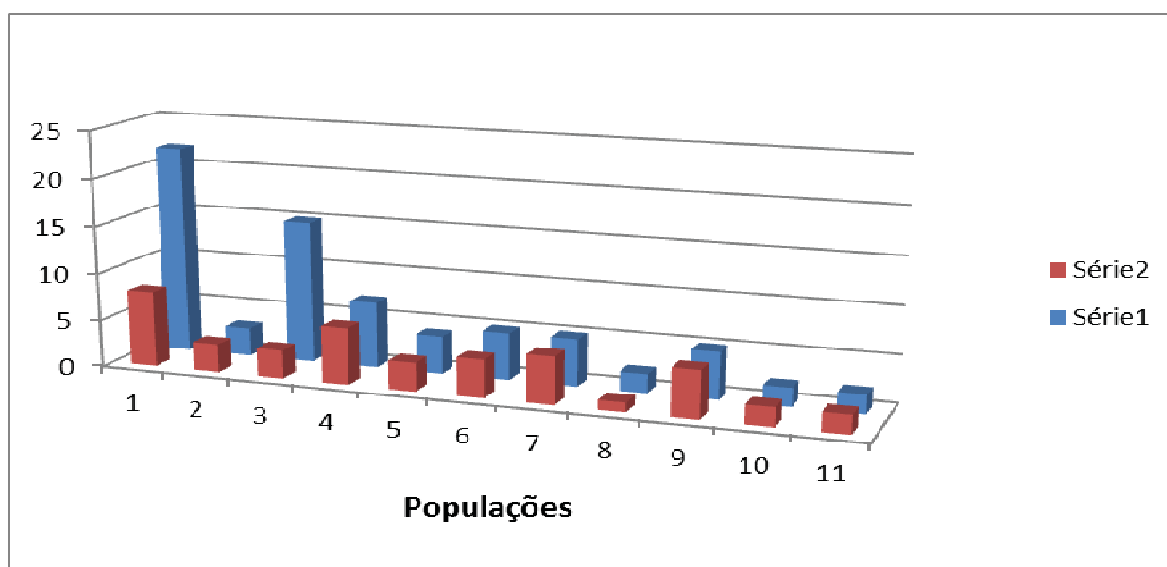


Figura 25. Populações (grupos) formadas com o programa STRUCTURE comparando o número de isolados e haplotipos obtidos com os 8 locos estudados.

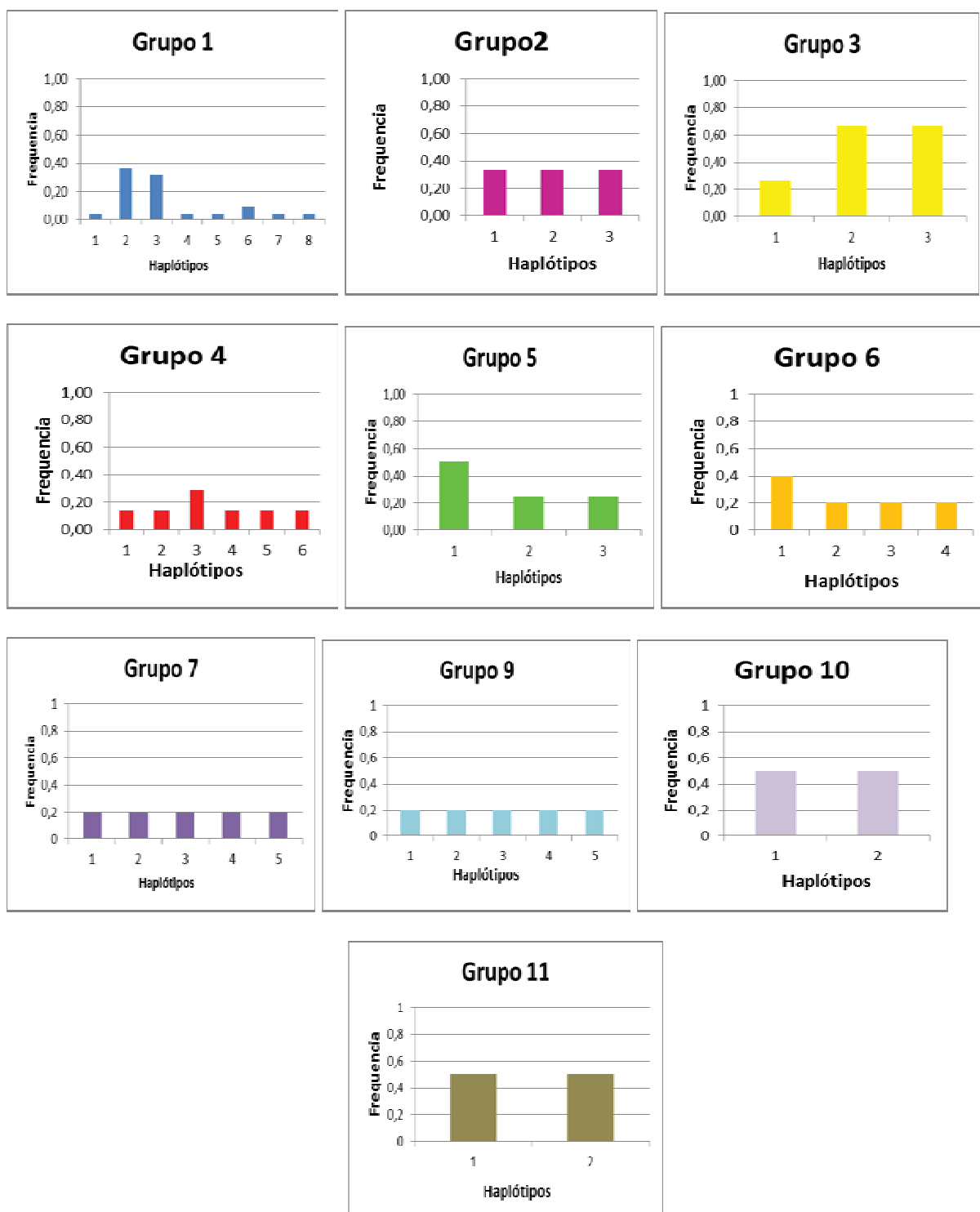


Figura 26. Histogramas das frequências de haplotipos obtidos com os oito locos de SSR, estimados para todos os grupos de *Beauveria* sp.

3.2. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Metarhizium* spp.

3.2.1. Frequência e distribuição de alelos em *Metarhizium* sp.

Todos os oito marcadores SSRs analisados pelo presente estudo revelaram padrões de picos gerados pelo software ABI Prism Genotyper versão 2.0 NT (Applied Biosystems) típicos de microssatélites, com um pico dominante principal e 1 a 3 picos gagueira fracos, exceto para alguns locos que apresentaram padrões combinados com ou sem excesso, causado pela TaqDNA polimerase conforme observado na Figura 27.



Figura 27. Loco Ma 164 e seus padrões de picos gerados pelo software ABI Prism Genotyper versão 2.0 NT (Applied Biosystems) típicos de microssatélites.

Os oito locos analisados apresentaram polimorfismo para *Metarhizium* sp. produzindo um total de 52 alelos na população com 68 isolados do fungo. Considera-se um loco polimórfico quando o alelo mais comum tem frequência inferior a 0,95 (ALFENAS, 1998). Os locos Ma 325 e Ma165 apresentaram o maior e o menor número de alelos, igual a 10 e 3, respectivamente. O número médio de alelos por loco de *Metarhizium* sp. foi de 6,5.

Do total de alelos encontrados, 28 (53,85%) apresentaram frequência menor que 0,05 (um alelo no loco Ma 165; dois alelos no loco Ma 164; três alelos nos locos Ma 145 e Ma 210; quatro alelos nos locos Ma 142 e Ma 195 e Ma 307 e; sete alelos no Ma 325), sendo estes denominados alelos raros (Figura 28). Os outros 24 alelos apresentaram frequência variando de 0,06 a 0,84.

3.2.2. Agrupamento dos isolados de *Metarhizium* sp.

Para a análise da diversidade sem hierarquização, empregando a abordagem bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE 2.3, foram testados 12 arquivos de parâmetros contendo valores de $k=1$ à $k=12$ com 5 corridas para cada valor de K , admitindo um valor sem mistura (pois as amostras de uma população são isoladas das outras), frequências alélicas correlacionadas, 100.000 “burnins” e 200.000 simulações de Monte Carlo de cadeias de Markov (MCMC). A seleção do número K mais provável foi realizada através dos valores de ΔK , de acordo com o método proposto por EVANNO et al. (2005). De acordo com a Figura 29, o valor de k ideal foi igual a 2. No entanto, apenas dois grupos proporcionou um agrupamento muito generalizado dos isolados e, portanto, foi gerada uma análise com valor de $k=5$.

No gráfico gerado pelo programa STRUCTURE 2.3 (Figura 30), cinco grupos de isolados foram formados: grupo azul, rosa, amarelo, vermelho e verde. De acordo com a tabela 21, 23 isolados (33,82% = isolados 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 36, 37, 41, 43, 51, 56 e 59.), 23 (33,82% = isolados 7, 9, 12, 21, 23, 24, 26, 29, 30, 32, 33, 39, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 55, 57, 58, 62 e 66), cinco (7,35% = isolados 27, 28, 35, 38 e 63), quatro (5,88% = isolados 25, 42, 44 e 47) e seis (8,82% = isolados 53, 60, 64, 65, 67 e 68) isolados foram agrupados no grupo azul, rosa, amarelo, vermelho e verde, respectivamente. Sendo assim, através do gráfico gerado pelo STRUCTURE 2.2. foi possível separar 89,71% dos isolados, sendo que os outros 10,29%, sete isolados, apresentaram misturas de cores e, para eles, foram criados mais 4 grupos separados. O sexto grupo foi constituído por quatro isolados (6, 22, 31 e 61) por estes apresentarem padrões de cores muito semelhantes. Os grupos sete, oito e nove, grupos com apenas um isolados, foram formados com os isolados 34, 40 e 54, respectivamente, que apresentaram padrões de cores únicos.

O grupo 1 é composto, em sua maioria, por isolados comerciais, de alguns institutos de pesquisa e alguns isolados de solo de canaviais. Os isolados M2, M5, M8, M10, M11, M13, M17, M19, M37, M41, M58 e M59 são tão semelhantes (distância genética igual a zero) foram geneticamente indênticos para os locos amostrados. O segundo grupo é basicamente formado por isolados do Instituto Biológico e Cenargem

e ainda por isolados provenientes de solos de canaviais da região do Oeste do Estado de São Paulo. Também foram observados para este grupo isolados geneticamente idênticos para os locos amostrados, incluindo M9, M12, M21, M23, M24, M28, M29, M30, M33, M39, M45, M46, M48, M49, M52, M55 e M66. O terceiro e quarto grupo é formado por isolados do Cenargem, um isolado da UEL, isolados do Instituto Biológico e de solo de canaviais. O grupo cinco é um grupo bem distante dos outros grupos com apenas 10% de elementos em comum, composto de isolados provenientes de solos de canaviais da Usina Central Energética do Estado de Goiás. Isso comprova que isolados, mesmo que tenham uma origem ancestral comum, são selecionados para características ambientais de cada região. Além disso, os isolados de uma mesma região podem variar entre si, como indicado pelo índice de similaridade variável de 0,75 a 0,30 dentro do grupo 5. O sexto grupo é mais diversificado composto por quatro isolados. Alguns isolados não se agruparam com nenhum outro isolado.

Foi também 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 31) permite visualizar a similaridade genética e separação dos isolados de *Metarhizium* sp. bem como a correspondência entre a análise pelo método aglomerativo (resulta no dendrograma) com o teste de atribuição (Structure). O valor de correlação cofenética $r = 0,9664$ indica que o dendrograma é pertinente. O resultado demonstra uma alta variabilidade entre os 68 isolados do fungo, formando cinco grupos divergentes:

- I. Isolados 27 e 38.
- II. Isolados 53, 60, 67, 68, 64 e 65.
- III. Subdividido em grupo 1 e grupo 2;
Grupo 1 – Isolados 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 36, 37, 41, 43, 51, 56 e 59.
Grupo 2 – Isolados 7, 9, 12, 21, 23, 24, 26, 29, 30, 32, 33, 39, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 55, 57, 58, 62 e 66.
- IV. Isolados 25, 42, 47 e 44.
Isolados 26, 35 e 63.

A representação da similaridade também pode ser observada na análise do gráfico de dispersão (Figura 32), sendo feita com todos os isolados para facilitar a visualização em três dimensões da estruturação observada. Os grupos formados no gráfico de dispersão correspondem aos grupos formados pelo STRUCTURE, podendo ser observados circulos com a mesma cor do STRUCTURE.

3.2.3. Variabilidade e Diversidade Genética de *Metarhizium* sp.

Para estudar a diversidade genética foram utilizados os nove grupos de *Metarhizium* sp. formados com auxílio do STRUCTURE 2.4. De acordo com a Tabela 19, os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) indica que 63,02% da variabilidade genética total foi explicada pela variação entre os grupos, enquanto a variância dentro dos grupos foi responsável por apenas 36,98%. O índice de fixação (F_{st}) foi igual a 0,63, indicando que houve elevada variabilidade genética entre os isolados de *Metarhizium* sp. principalmente entre os grupos formados. Estes dados são diferentes dos encontrados por Freed et al. (2010) analisando a variabilidade genética de diferentes origens geográficas da China, Laos, Coreia do Sul e Singapura. Apesar de estudarem diferentes países, esses autores determinaram que 80,65% da variação genética total foi devido à variabilidade dentro das populações ($F_{st} = 0,1975$), sendo o fato atribuído às diferenças climáticas entre os locais de amostragem, principalmente na China. Mesmo em escala regional, estudando a variabilidade de 104 isolados de *Metarhizium anisopliae* em três regiões da Suíça, utilizando 41 locos microssatélites, Oulevey et al. (2009) determinaram que 86,45% da variação genotípica total foi atribuída à variância dentro das coleções. No caso do presente estudo, a menor variabilidade entre os grupos pode ser atribuída ao fato de a AMOVA ter sido feita posteriormente à formação desses grupos com base na análise dos gráficos gerados pelo STRUCTURE. Estudos futuros são necessários para fazer a AMOVA considerando regiões, hospedeiros e origens dos isolados.

Considerando os 68 isolados, a diversidade genética média (H) entre os locos foi de 0,1390, variando de 0,0294 a 0,4917 entre os 52 alelos obtidos (Tabela 20). Já a diversidade genética para cada um dos nove grupos formados pelo STRUCTURE variou de 0,0210 a 0,2423 (Tabela 21). A menor diversidade genética foi encontrada

nos grupos 1 e 2 com H igual 0,0324 e 0, 0210, respectivamente. Essa baixa diversidade genética encontrada pode ser atribuída ao fato de que estes grupos são grandes e homogêneos possuindo haplotipos dominantes, com um número elevado de indivíduos compartilhando os mesmos alelos. O grupo 1, exemplifica bem esta questão, pois em sua maioria, os isolados comerciais são clones de um isolado tido como matriz, o isolado M 5. Este estudo de diversidade genética nos mostra como está a questão do uso de fungos entomopatogênicos no Brasil, e quanto isso pode interferir na eficiência deste controle, pois o uso de poucos isolados em escala nacional pode ocasionar uma redução na diversidade genética destas gêneros e conseqüentemente, uma redução de características genéticas que influenciam a patogenicidade destes fungos. Por outro lado, os grupos 3 e 5 foram os mais diversos com H igual a 0,2423 e 0, 1756, respectivamente. O grupo 3 é um grupo bem heterogêneo, constituídos por isolados de diferentes países (Colômbia, França e Brasil), de diferentes hospedeiros (*Ancognatha scarabacoides*, *Migdolus* sp. e *Otiorhynchus sulcatus*) e diferentes espécies (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metathizium flavoviride* var. *flavoviride*). Já o grupo 5 é formado por isolados provenientes da mesma região geográfica, sendo todos provenientes de amostras de solos de canaviais da cidade de Morrinho-GO, com exceção do isolado M 60 que foi obtido de pastagens de Cerqueira César-SP.

3.2.4. Estrutura Populacional de *Metarhizium* sp.

De acordo com a Figura 33, foram identificados 40 haplotipos a partir dos oito locos utilizados, dentre os 68 isolados estudados, sendo que o grupo 1 apresentou o maior número de haplotipos igual a 11 e os grupos 7, 8 e 9 foram constituídos por apenas um isolado (Figura 34). A similaridade entre os haplotipos obtidos variou entre 8 e 100%. Os haplotipos 1.2 (Gupo1.Haplotipo2) e 2.2 foram altamente abundantes com frequência de 0,52 e 0,73 em seus respectivos grupos, ou seja, para os haplotipos 1.2 e 2.2. foram identificados 12 e 17 isolados, respectivamente. Portanto, 42,64% (17,64% + 25,00%) do total de 68 isolados estudados pertencem a apenas dois haplotipos. 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).

No presente estudo, o haplotipo dominante 1.2 pode ser representado pelo isolado M5, que originalmente é o ESALQ PL49 de *Metarhizium* sp. coletado pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq/USP), no Nordeste brasileiro, sobre cadáver de *Mahanarva posticata* (cigarrinha das folhas da cana-de-açúcar). A dominância desse haplotipo pode possivelmente ser atribuída ao fato de que grande parte dos isolados foram obtidos em laboratórios que produzem comercialmente o fungo e de solos de cultivo com a cana-de-açúcar. O isolado M2 foi isolado de arroz com esporos do fungo fornecido pelo Laboratório da Usina São Martinho. O isolado M8 foi fornecido pelo Laboratório da Empresa Biocana e M13 e M17 pela Methavida. Como a ESALQ fornece isolados como matrizes para a produção comercial de *Metarhizium*, pode-se dizer que esses isolados têm como ancestral comum o isolado esalqueano PL49 pós-produção comercial. Os isolados M41, M56 e M59 foram isolados de solos cultivados com cana-de-açúcar em Junqueirópolis-SP, Lucélia-SP e Morrinho-GO, respectivamente. Essas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, em algum momento anterior à coleta da amostra, podem ter sido provavelmente pulverizadas com esporos de *Metarhizium* sp. adivindos de laboratórios comerciais que utilizam o isolado PL49 como matriz. Intrigante é o fato do isolado M19, ter sido isolado na Austrália de *Austracris glutulosa* e pertencer ao mesmo haplotipo 1.2.

A dominância do haplotipo 2.2., representada pelo isolado M21 pode ser explicada pela especificidade de *Metarhizium* sp. ao inseto hospedeiro cigarrinha das pastagens *Deois flavopicta*. Dos seis isolados (M21, M22, M23, M24, M26 e M29) obtidos em cadáveres dessa espécie, cinco pertencem a esse haplotipo, sendo os Estados do Amazonas, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Goiás e Tocantins representados por um isolado cada. Apenas o isolado M22, isolado de *Deois flavopicta* no Estado do Espírito Santo, não pertence ao mesmo haplotipo (Figura 31) nem ao mesmo grupo do STRUCTURE (Figura 30). Porém, esse isolado foi incluído no Grupo 6 do STRUCTURE subjetivamente por apresentar uma mistura de cores, mas apresentou acima de 30% da cor rosa que identifica o Grupo 2 ao qual pertence os isolados de *Deois flavopicta*. O interessante é que isolados geneticamente idênticos foram obtidos de *Deois flavopicta*,

independentemente da origem geográfica, sugerindo existência de correlação do genótipo do fungo com o inseto hospedeiro causada por especificidade patógeno-hospedeiro. Suportando essa hipótese, os isolados M25, M27, M28, M34, M35 constituem haplotipos formados por apenas um isolado obtido a partir de cadáveres de *Monolonivon annulipes*, *Ancognata scarabacoides*, *Migdolus* sp., *Xyloryctes jamaicensis*, e *Otiorhynchus sulcatus*, respectivamente. Os isolados incluídos no haplotipo 2.2., M55 (Garça-SP) e M57 (Águas de Santa Bárbara), foram obtidos de solos de pastagens que são as principais hospedeiras de *Deois flavopicta*, o que indica que podem ter sido selecionados por esse inseto. A inclusão de M48 e M49 isolados em Junqueirópolis-SP e M52 e M66 originários de Quatá-SP e Morrinho-GO, respectivamente, todos de amostras de solos de canaviais, pode ser explicada pelo fato de que, apesar de *Deois flavopicta* preferir pastagens, a praga também ataca a cana-de-açúcar, podendo ser importante em condições especiais, principalmente em cultivos próximos a pastagens ou altamente infestados com *Brachiaria*. A pressão de seleção exercida pelo inseto hospedeiro sobre a população de *Metarhizium* sp. em função da especificidade patógeno-hospedeiro foi também observada por Bridge et al. (1997); Fungaro et al. (1996) e St. Leger et al. (1992). Esse fato tem implicações práticas altamente relevantes para o sucesso de programas de controle biológico de pragas que utilizam *Metarhizium*. Um único haplotipo dificilmente controlará várias espécies de pragas que ocorrem 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. O mesmo problema pode ocorrer se a região onde for feita a aplicação do fungo apresentar condições climáticas muito divergentes daquela onde o haplotipo foi obtido, devido à adaptação de *Metarhizium* sp. a temperaturas e intensidades de luz específicas. Em Ontário, no Canadá, foi demonstrado que habitats de agricultura e de floresta suportaram dois grupos genéticos distintos de *Metarhizium* sp. adaptados a condições específicas de temperatura e de luminosidade do respectivo habitat (BIDOCHKA et al. 2001; BIDOCHKA e SMALL 2005). Oulevey et al. (2009) explicam que genótipos deste fungo podem reagir

diferentemente aos fatores do ambiente como temperatura (BIDOCHKA et al., 2001; RANGEL et al., 2005), umidade (LAZZARINI et al., 2006; MILNER et al., 1997), radiação solar (BIDOCHKA et al., 2001; BRAGA et al., 2001) or tipo de solo (QUESADA-MORAGA et al., 2007) e eles variam em sua virulência (FERGAN et al., 1993; MURAD et al., 2006) e especificidade para insetos hospedeiros (BRIDGE et al., 1997; FUNGARO et al., 1996; ST. LEGER et al., 1992).

Através da técnica de microssatélites utilizada no presente estudo, foi possível a identificação de 37 (54,41% do total de isolados) (Figura 33) haplótipos com apenas um isolado, variando de 1 a 9 dentro dos grupos, indicando, portanto, a existência de ampla diversidade genética em escala regional e mesmo dentro de uma fazenda. Os isolados M53, M64, M65, M67, M68 foram todos isolados da Fazenda Boa Esperança, no Estado de Goiás, e, apesar de estarem todos reunidos no Grupo 5 pelo STRUCTURE, nenhum deles pertence ao mesmo haplotipo, indicando variabilidade mesmo dentro de uma mesma área. 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.

Os marcadores SSRs apresentam alta capacidade para identificação de isolados (haplotipos) e caracterização de coleções de isolados de *Metarhizium* sp., também sendo correspondentes para isolados de *Beauveria* sp. Além disso, se constituem em 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 e evitar contaminações e/ou mutações e monitorar produtos udo do produto para evitar a clonagem de seus isolados superiores. A utilização dos SSRs pode assumir uma dimensão ainda maior a nível nacional e governamental para o registro de isolados e de produtos técnicos ou produtos formulados e monitorar a biodiversidade de *Metarhizium* sp. e sua exploração para o controle de insetos pragas.

3.2.5. Correlação entre Distância Genética e Patogenicidade dos isolados de *Metarhizium* sp.

Foram realizadas análises de correlação entre a distância genética e agressividade dos isolados de *Metarhizium* sp. Os dados de correlação foram obtidos através de

comparação entre as respectivas distâncias Euclidianas utilizando o Teste de Mantel (estatística de teste de correlação entre duas matrizes) no programa PAST com 5.000 permutações.

Os resultados de Correlação $R = 0,01779$ e P valor associado = $0,302$ (não significativo $> 0,05$) demonstram que não houve correlação da agressividade com a distância genética dos isolados.

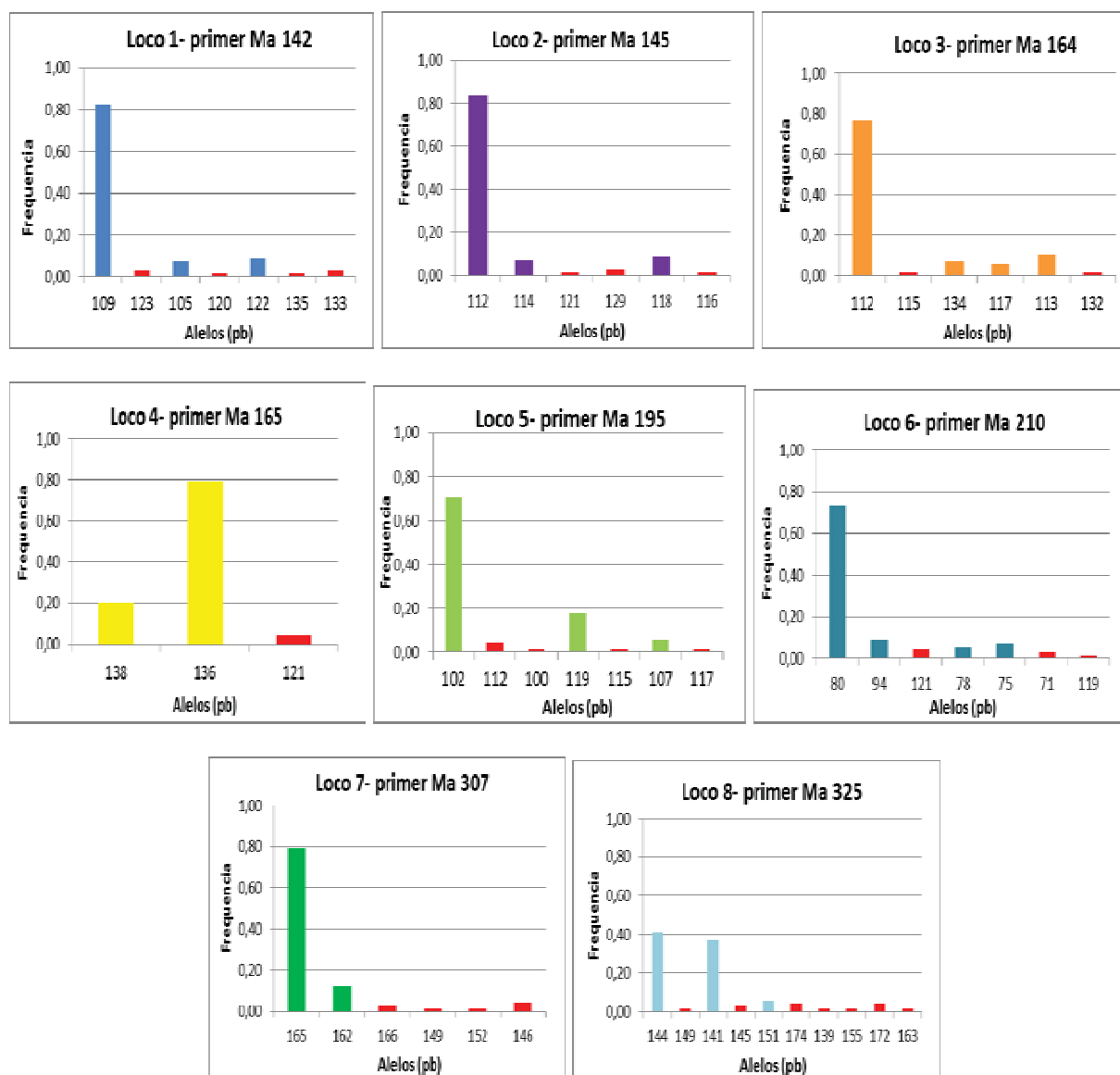


Figura 28. Histogramas das frequências alélicas dos oito locos de SSR, estimados para todos os isolados de *Metarhizium* sp. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o tamanho do alelo. Barras na cor vermelha indicam alelos raros (frequência menor que 0,05).

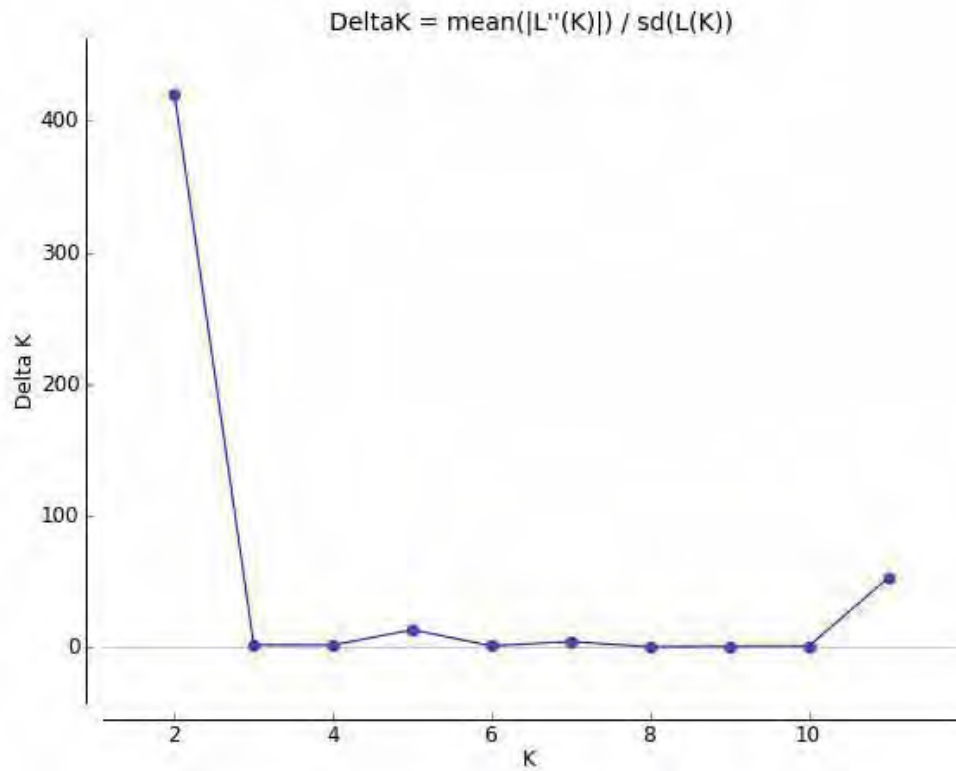


Figura 29. Valores de ΔK para cada valor de K calculado para os isolados do fungo *Metarhizium* sp., de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005). O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo.

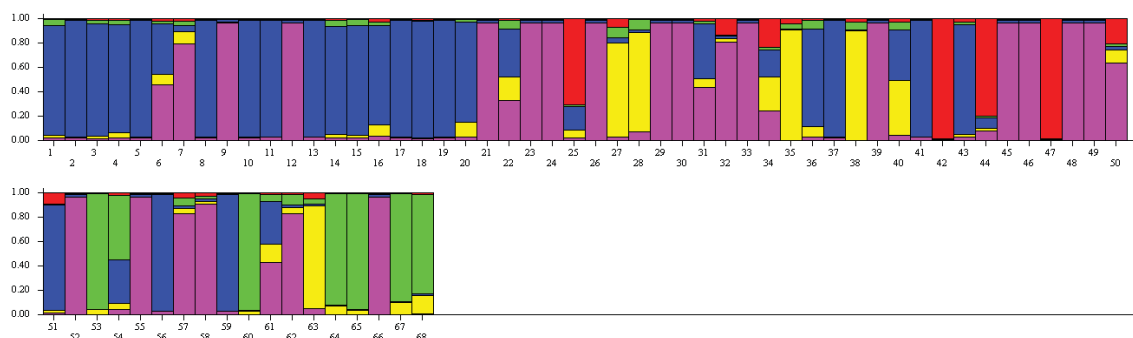


Figura 30. Teste de atribuição para os isolados do fungo *Metarhizium* sp. ($K=5$). Isolados representados pelas barras verticais coloridas. A mesma cor em isolados diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indica a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. Para a identificação dos isolados (Tabela X). O eixo das coordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo (Q).

Tabela 21 – Grupo de isolados formados pelo programa STRUCTURE 2.3.

GRUPO 1								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (% EM OVOS)	INFECTIVIDADE (% EM CRISÁLIDA)	INFECTIVIDADE (% EM MARIPOSA)	INFECTIVIDADE (% EM LAGARTA)	MÉDIA DO PARASITISMO (%)
M 1	COMERCIAL 1	desconhecido	desconhecido	100	16	0	56	54
M 2	COMERCIAL 2	desconhecido	desconhecido	0	64	0	68	33,6
M 3	COMERCIAL 3	desconhecido	desconhecido	100	92	100	76	89,6
M 4	COMERCIAL 4	desconhecido	desconhecido	80	84	0	56	54,8
M 5	ESALQ PL49	<i>Ahanarva posticata</i>	desconhecido	40	80	0	64	45,6
M 8	COMERCIAL 7	desconhecido	desconhecido	100	44	96	56	76
M 10	COMERCIAL 9	desconhecido	desconhecido	100	28	100	40	68,8
M 11	COMERCIAL 10	desconhecido	desconhecido	100	100	100	52	80,8
M 13	COMERCIAL 13	desconhecido	Catiguá-SP	100	68	92	56	77,6
M 14	COMERCIAL 14	desconhecido	Catiguá-SP	100	44	100	40	70,4
M 15	COMERCIAL 15	desconhecido	Catiguá-SP	60	64	100	52	65,2
M 16	COMERCIAL 16	desconhecido	Catiguá-SP	100	100	100	80	92
M 17	COMERCIAL 17	desconhecido	Catiguá-SP	100	88	100	60	82,8
M 18	UEL 50 - 1	<i>Stegana Catanea</i>	Londrina-PR	100	80	92	56	78,8
M 19	CG 291- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> - USDA- ARS (ARSEF 324; CSIRO FI-985)	<i>Austracris guttulosa</i>	Queensland - Austrália	100	72	100	56	79,6
M 20	CG 442- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> - USDA- ARS (ARSEF; IMI 324673)	<i>Zonocerus elegans</i>	Tanzânia	60	100	100	8	51,2
M 36	CG 645- <i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> - CSIRO	<i>Pemphigus trehemi</i>	Reino Unido	0	100	100	72	58,8
M 37	Ma 283- <i>Metarhizium anisopliae</i> - UEL	Solo	Sapezal- Mato Grosso	100	96	100	52	80,4
M 41	Usina Rio Vermelho	Solo - Cana	Junqueirópolis- SP	0	80	100	20	36
M 43	IBC 383- Instituto Biológico	<i>Ahanarva fimbriolata</i>	Água Branca- PB	100	96	100	92	96,4
M 51	Solo 48- Paraguaçu Paulista	Solo -cana	Paraguaçu Paulista- SP	100	92	100	44	76,8
M 56	Solo- Usina Bioenergia do Brasil S/A	Solo - cana	Lucélia- SP	100	100	100	68	87,2
M 59	Solo 64 - Cachoeira Alta - S.P.- Faz. Boa Esperança	Solo -cana	Cachoeira Alta- GO	100	100	100	84	93,6
MÉDIA				80	77,74	81,74	56,87	70,87

Tabela 21 – Grupo de isolados formados pelo programa STRUCTURE 2.3.(continuação)

GRUPO 2								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISÁLIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTA	MÉDIA DO PARASITISMO (%)
M 9	COMERCIAL 8	desconhecido	desconhecido	80	84	76	48	66,8
M 12	COMERCIAL 11	desconhecido	desconhecido	100	100	100	80	92
M 21	CG 29- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Manaus- Amazonas	0	80	100	72	56,8
M 23	CG 31- <i>Esalq - Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Rio de Janeiro	100	92	100	84	92,8
M 24	CG 35- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Mato Grosso	100	100	100	96	98,4
M 26	<i>anisopliae</i> - Embrapa Arroz e Feijão (CP3; ARSEF 759)	<i>Deois flavopicta</i>	Goiânia- Goiás	100	80	100	96	96,4
M 29	CG 581- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Colinas do Tocantins- Tocantins	100	100	100	72	88,8
M 30	CG 632- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Acromymex</i> sp.	Distrito Federal - Brasília	0	100	100	56	52,4
M 32	CG 825- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Eupalamides didalus</i>	Tailândia	100	100	100	100	100
M 33	CG 835- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Scaptocoris catanea</i>	Dom Aquino- Mato Grosso	0	100	100	40	46
M 39	IBC 59 - Instituto Biológico	desconhecido	desconhecido	100	80	100	56	80,4
M 45	IBC 630- Instituto Biológico	desconhecido	desconhecido	100	100	100	96	98,4
M 46	IBC 631- Instituto Biológico	desconhecido	desconhecido	100	100	100	92	96,8
M 48	Solo 19- Usina Rio Vermelho	Solo -cana	Junqueirópolis- SP	100	92	100	84	92,8
M 49	Solo 20- Usina Rio Vermelho	Solo -cana	Junqueirópolis- SP	100	100	100	84	93,6
M 50	Solo 51- Paraguaçu Paulista	Solo -cana	Paraguaçu Paulista-SP	100	96	100	92	96,4
M 52	Solo 55- Usina Quatá- S.P.	Solo -cana	Quatá- SP	100	88	100	72	87,6
M 55	Solo 04- Garça S.P.	Solo-pasto	Garça- SP	100	96	100	72	88,4
M 57	Solo 13- Águas de Santa Barbara- S.P.	Solo-pasto	Águas de Santa Barbara -SP	100	84	100	48	77,6
M 58	Solo 25- Usina Rio Vermelho	Solo -cana	Santa Mercedes- SP	100	100	100	84	93,6
M 62	Solo 192- Usina Rio Vermelho	Cana	Junqueirópolis- SP	0	100	100	64	55,6
M 66	Solo 63 ₂ - Fazenda Boa Esperança 2	Cana	Cachoeira Alta- GO	100	100	100	60	84
MÉDIA				80,91	94,18	98,91	74,91	83,44
GRUPO 3								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISÁLIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTA	MÉDIA DO PARASITISMO (%)
M 28	CG 426- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> - UFGO	<i>Migdolus</i> sp.	Goiania- Goiás	100	68	100	72	85,6
M 35	CG 439- <i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> - USDA- ARS (ARSEF 2024; CBS 700.74)	<i>Otiorynchus sulcatus</i>	USDA- ARS- França	40	100	100	40	58
M 38	Ma 36- <i>Metarhizium anisopliae</i> - UEL	Solo	Rolândia- Paraná	60	100	100	60	72
M 63	Solo 63 ₂ - Fazenda São José	Cana	Cachoeira Alta- GO	0	100	92	36	42,8
MÉDIA				50	92	98	52	64,60
GRUPO 4								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISÁLIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTA	MÉDIA DO PARASITISMO (%)
M 42	IBC 185- Instituto Biológico	desconhecido	desconhecido	100	100	100	76	90,4
M 44	IBC 425- Instituto Biológico	Solo Mata Atlântica	Iporanga- SP	100	100	100	92	96,8
M 47	Solo 43- Analândia - S.P.	Solo -cana	Analândia- SP	100	88	100	72	87,6
				100	96	100	80	91,60

Tabela 21 – Grupo de isolados formados pelo programa STRUCTURE 2.3.(conclusão)

GRUPO 5								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISÁLIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTA	MEDIA DO PARASITISMO (%)
M 60	Solo 16- Usina TGM	Solo-pasto	Cerqueira César - SP	100	100	100	56	82,4
M 64	Solo 65 ₁ - Fazenda Boa Esperança 2	Cana	Cachoeira Alta- GO	0	100	100	60	54
M 65	Solo 65 ₂ - Fazenda Boa Esperança 2	Solo-cana	Cachoeira Alta- GO	20	100	100	28	47,2
M 67	Solo 65 ₄ - Fazenda Boa Esperança 2	Cana	Cachoeira Alta- GO	0	100	100	52	50,8
M 68	Solo 65 ₂ - Fazenda Boa Esperança 2	Cana	Cachoeira Alta- GO	20	100	100	32	48,8
				28	100	100	45,6	56,64
GRUPO 6								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISÁLIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTA	MEDIA DO PARASITISMO (%)
M 22	CG 30- Esalq - <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Espírito Santo	0	100	100	32	42,8
M 31	CG 799- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> - UFGO	<i>Mahanarva posticata</i>	Goianésia- Goiás	0	60	100	52	46,8
M 61	Solo 30- Margem do Rio Paraná	Solo	Paulicéia - SP	100	100	100	92	96,8
				33,33	86,67	100,00	58,67	62,13
GRUPO 7, 8 e 9								
CÓDIGO DO ISOLADO	ORIGEM	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL DE COLETA	INFECTIVIDADE (%) EM OVOS	INFECTIVIDADE (%) EM CRISÁLIDA	INFECTIVIDADE (%) EM MARIPOSA	INFECTIVIDADE (%) EM LAGARTA	MEDIA DO PARASITISMO (%)
M 34	CG 320- <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> - USDA	<i>Xyloryctes jamaicensis</i>	Samoa Ocidental - EUA	100	100	100	72	88,8
M 40	IBC 156 - Instituto Biológico	Solo	Cascável- PR	100	100	100	88	95,2
M 54	Solo 26- Usina Rio Vermelho	Solo-pasto	Junqueirópolis- SP	60	84	100	44	64



R = 0,9664

Figura 31. Dendrograma baseado na similaridade de Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA pela análise dos alelos gerados por oito locos SSR de 68 isolados de *Metarhizium* sp. A consistência dos nós foi obtida através de 10.000 reamostragens “bootstrap”. As cores correspondem aos grupos obtidos na análise do Structure. A linha tracejada corresponde à linha imaginária para a separação dos agrupamentos. Algarismos romanos indicam os cinco grupos principais encontrados.

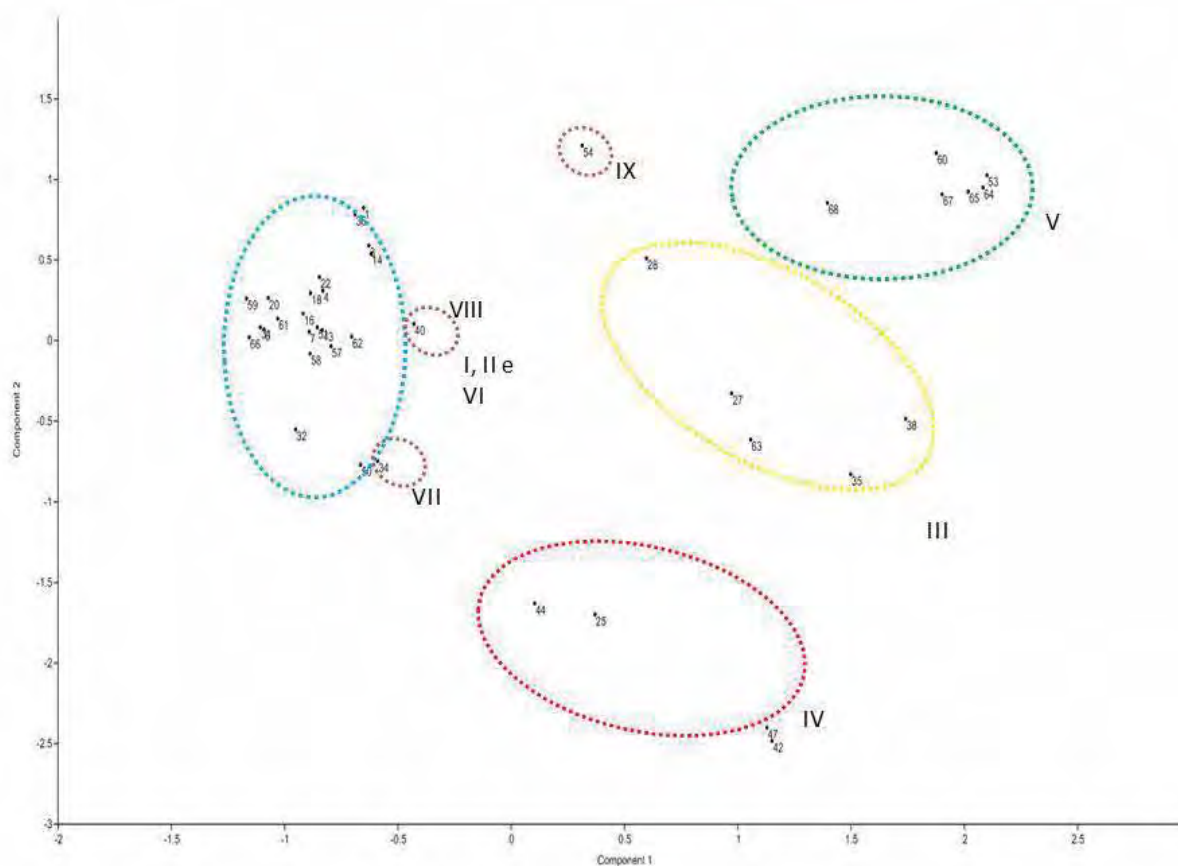


Figura 32. Gráfico de dispersão por coordenadas principais obtido por SSR e similaridade genética dos 68 isolados *Metarhizium* sp.

Tabela 22. Análises de Variância Molecular (AMOVA) resultados e índice de fixação (F_{st}^{θ}) de Sequencias Simples Repetidas (SSR) de isolados de *Metarhizium* sp.

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage variation
SSR				
Among populations	8	149.357	2.68028 Va	63.02
Within populations	59	92.805	1.57297 Vb	36.98
Total	67	242.162	425324	
Fixation Index	Fst	0.63017		

Tabela 23. Sequência dos Primers de Microssatélites e características dos 8 locos de microssatélites de *Metarhizium* sp. Primers Microssatélites de *Metarhizium* sp. locus identificados (Número de acesso do GenBank), padrão de repetição, sequências dos primers forward (F) e reverse (R), temperatura de anelamento, (tamanho do intervalo observado entre diferentes espécies; número de alelos observados) em bp.

GenBank Accession no.Locus *	Repeat motif	Primer sequence (52–32)	Annealing temp. (°C)	(no. of alleles, size range) in pb	He
Ma142	(CA)8(CGC)5	F: GACGGTATATTTATGATCAGCTCG	56,3	(8, 106–134)	0,07
AY842939		R: TCGGGAACCTAGACTTTAAGTATCAC			
Ma145	(A)14/(AC)6(AT)3	F: CCGTACTTGGTACATATTCCTGATG	55,6	(13, 105–135)	0,11
AY842940		R: GGGATGTCCGCATTTCGAA			
Ma164	(CA)9(ACACA)5	F: GCACTCAACCAAGAGCGAGG	63,9	(7, 110–134)	0,014
AY842941		R: CAACGTCACCTGTGGCACAC			
Ma165	(CA)4	F: CGACATTTACCGTTGTACATATG	61,4	(7, 120–140)	0,24
AY842942		R: GGACTGGGAGTTTGGAGCTC			
Ma195	(CA)16	F: AATTATAAACTGAAGAAACAGAAA	57,5	(10, 100–128)	0,24
AY842943		R: GTGTTCTAGTGACCTCCTTACT			
Ma210	(CA)17	F: CCCGAGGCCTGTAGTCTACG	57,5	(12, 72–166)	0,14
AY842944		R: TTTCTGGAAAGGCAAGAAGCTT			
Ma307	(AGG)3CTG(AAG)2GAG(AAG)4(AGG)3	F: CATGCTCCGCCTTATTCCTC	57,5	(6, 144–165)	0,14
AY842945		R: GGGTGGCGAAGAAGTAGACG			
Ma325	(A)8G(A)10/(TG)12	F: TTTATTGTGGTGGAGATGCCA	58,1	(16, 107–175)	0,04
AY842946		R: CATGATAAAAGGTCATGTTTGCC			
Mean				6,5	0,139

Tabela 24. Diversidade Genética por alelos dos grupos de *Metarhizium* sp. formados pelo STRUCTURE. Os grupos 7, 8 e 9 não possuem valores de diversidade genética, pois possuem apenas um isolado em cada grupo.

Alelos	Diversidade Genética dos Grupos					
	1	2	3	4	5	6
h1	0.0000	0.0000	0.4000	0.5000	0.3333	0.0000
h2	0.0870	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000
h3	0.0000	0.0000	0.6000	0.5000	0.0000	0.0000
h4	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000
h5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000
h6	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000
h7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5333	0.0000
h8	0.0000	0.0000	0.4000	0.6667	0.3333	0.0000
h9	0.0000	0.0000	0.4000	0.5000	0.0000	0.0000
h10	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000
h11	0.0000	0.0000	0.0000	0.6667	0.0000	0.0000
h12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000

Diversidade Genética dos Grupos						
Alelos	1	2	3	4	5	6
h13	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000
h14	0.0870	0.2372	0.4000	0.5000	0.3333	0.0000
h15	0.0870	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h16	0.0870	0.0000	0.6000	0.0000	0.3333	0.0000
h17	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h18	0.0000	0.0870	0.6000	0.0000	0.5333	0.0000
h19	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000
h20	0.3004	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000	0.0000
h21	0.1660	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000	0.5000
h22	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3333	0.5000
h23	0.3557	0.0870	0.4000	0.5000	0.0000	0.0000
h24	0.0870	0.0000	0.4000	0.0000	0.3333	0.0000
h25	0.0000	0.0870	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h26	0.1660	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000	0.0000
h27	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000
h28	0.0870	0.0000	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000
h29	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000
h30	0.0870	0.0870	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000
h31	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000	0.0000
h32	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000	0.0000
h33	0.0870	0.0870	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h34	0.0000	0.0870	0.0000	0.5000	0.6000	0.0000
h35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5333	0.0000
h36	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000
h37	0.0000	0.1660	0.6000	0.0000	0.6000	0.0000
h38	0.0000	0.1660	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h39	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000
h40	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000
h41	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000
h42	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000
h43	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	0.5333	0.0000
h44	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000
h45	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.0000	0.0000
h46	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6667
h47	0.0000	0.0000	0.4000	0.5000	0.0000	0.0000
h48	0.0000	0.0000	0.6000	0.0000	0.3333	0.0000
h49	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
h50	0.0000	0.0000	0.4000	0.0000	0.0000	0.0000
h51	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5333	0.5000
h52	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000
Média	0.0324	0.0210	0.2423	0.1218	0.1756	0.0609

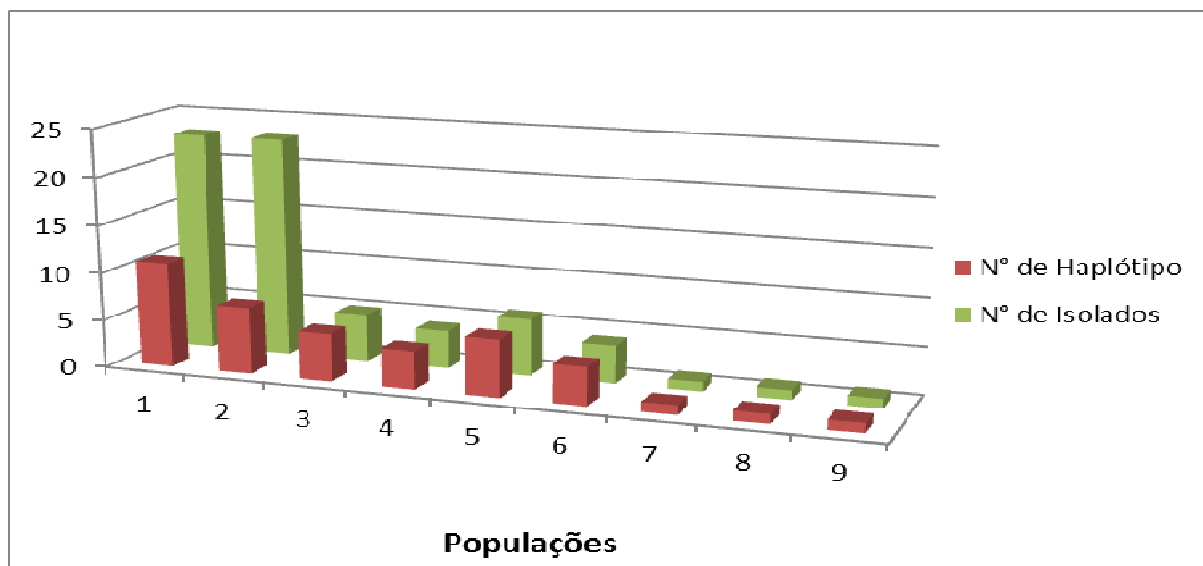


Figura 33. Populações (grupos) formadas com o programa STRUCTURE comparando o número de isolados e haplótipos obtidos com os 8 locos estudados.

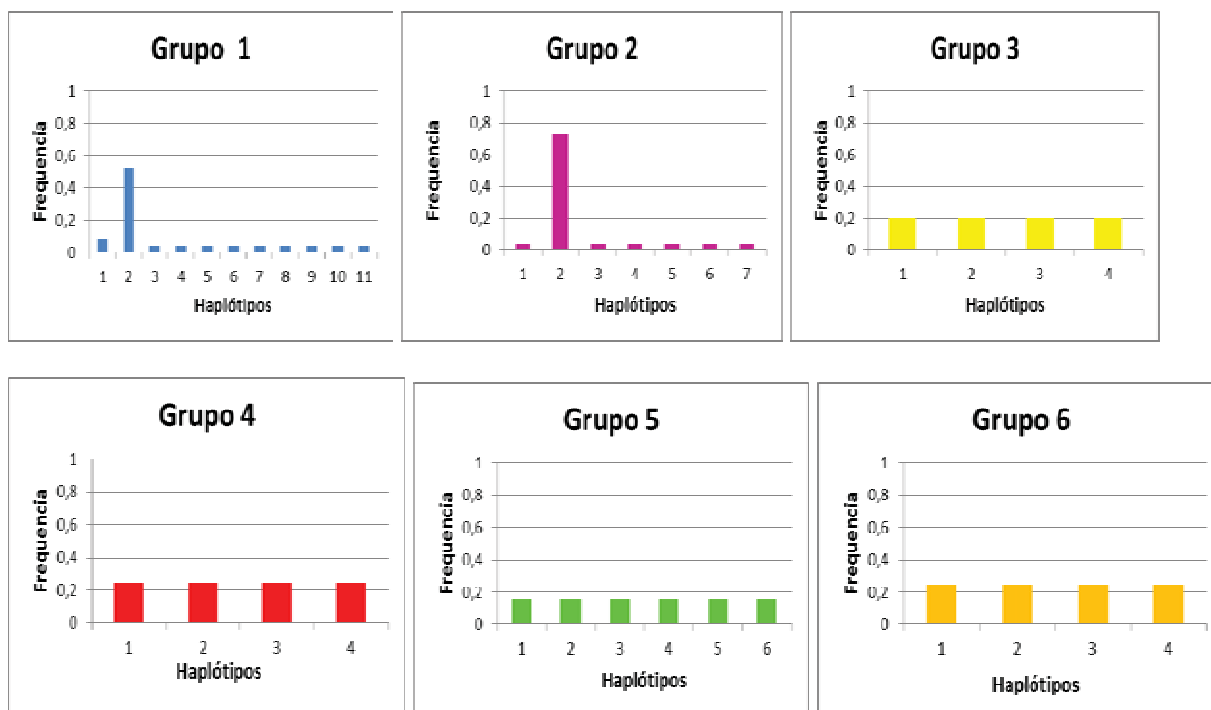


Figura 34. Histogramas das frequências de haplótipos obtidos com os oito locos de SSR, estimados para todos os grupos de *Metarhizium* sp.

CONCLUSÕES GERAIS

- As metodologias utilizadas foram eficazes para separar os isolados quanto ao grau de Patogenicidade para ovos, lagartas, crisálidas e adultos;
- Existe variabilidade quanto à patogenicidade dos isolados;
- Cada isolado apresenta diferente capacidade de afetar ovos, lagartas, crisálidas e adultos;
- É possível encontrar isolados com potencial para infectar todas as fases do desenvolvimento de *D. saccharalis*;
- Os isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. estudados, apresentaram alta diversidade genética;
- Notável variabilidade genética foi observada entre os grupos de genótipos formados pelo programa STRUCTURE, tanto para *Metarhizium* sp. quanto para *Beauveria* sp., porém houve baixa variabilidade genética dentro dos grupos;
- Isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. provenientes de uma mesma área ou hospedeiro apresentaram grande variabilidade;
- Com o uso dos marcadores SSR foi possível identificar que a maioria dos isolados estudados possuem ancestrais comuns com isolados comerciais e de institutos de pesquisa.
- Os marcadores SSRs apresentam alta capacidade para identificação de isolados (haplotipos) e caracterização de coleções de isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível selecionar isolados com potencial para uso no controle biológico de todas as fases do desenvolvimento de *Diatraea saccharalis*, sendo 10 isolados de *Metarhizium* sp. e 10 isolados de *Beauveria* sp. Estes isolados foram selecionados com base nos dados obtidos de patogenicidade, local de origem, especificidade por hospedeiros e identidade genética. Portanto, é de suma importância o prosseguimento dos estudos com os isolados selecionados. Serão necessários estudos mais específicos com este grupo de isolados, como teste de Concentração Letal 50 e 90% (CL50= Concentração necessária para matar 50% dos indivíduos e CL90 Concentração necessária para matar 90% de indivíduos) e Tempo Letal 50 e 90% (TL50= Tempo capaz de matar 50% de indivíduos e TL90 = Tempo capaz de matar 90% de indivíduos) para padronização do bioinseticida e obter maior eficiência no controle. Também será necessário avaliar a capacidade de esporulação de cada isolado em sistema de produção em larga escala, pois esta é uma das características fundamentais de um bioinseticida.

É importante investigar a capacidade de distribuição e persistência e o potencial de realizar permuta gênica dentro de uma mesma população e com outras populações. Futuros estudos devem caminhar nesta direção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2009. p. 235-259.
- 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* during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.96, p.187-192, 2007
- ALBERNAZ D. A. S.; TAI M. H. H.; LUZ C. 2009. Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. **Med Vet Entomol** 23: 141-147.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C. W. 1979. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons.
- ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Selection of *Beauveria spp.* isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). **Journal of Applied Entomology**, v. 121, n. 9/10, p. 539-543, 1997.
- 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 et al. 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.

ARRUDA, W. **Caracterização moleclar e morfofisiologica de diferentes isolados do fungo entomopatogenico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. 2005. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - 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.

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

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.

BARCI, L. A. G.; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, J. E.M.; NOGUEIRA A. H. C.;PRADO, A. P. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes:Clavicipitaceae) com carrapaticidas químicosutilizados no controle do carrapato dos bovinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 18, supl. 1, p. 63-68, dez.2009

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

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.

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.

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. **Journal Invertebr Pathol**, v. 71, p. 145–150, 1998.

BEYS SILVA, W. et al. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochem**, v. 40, p. 321–326, 2005.

BIDOCHKA, M. J. et al. 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.; SMALL C. L. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: Vega FE, Blackwell M (eds), *Insect-Fungal Associations – Ecology and Evolution*. Oxford University Press, Oxford, pp. 28–50.

BIDOCHKA, M. J.; LEGER, S. T.; ROBERTS, R. J. 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. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* 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. et al. 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.

BRAGA, D. P. V. et al. 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. et al. The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Mycology**, v. 111, p. 85-90, 1990.

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. et al. 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. et al. 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.

CAMPOS, D. A.; et al. On a new peirosaurid crocodyliform from the Upper Cretaceous, Bauru Group, southeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 83(1): 317–32, 2011.

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. 2011.

CÉSAR FILHO, E.; MARQUES, E.J.; BARROS, R. Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates to control *Alabama argillacea* (Huebner) caterpillars. **Scientia Agrícola**, v.59,n.3, p.457-462, 2001

CHANDLER, D. et al. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, v.10, p.357-384, 2000.

CINTRA, E.R.R.; ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; SANO, A.H.; ZAPPELINI, L.O.; WENZEL, I.M.; AZEVEDO FILHO, J.A. Seleção de Isolados de *Metarhizium anisopliae* para o controle da cigarra do café *Fidicina* sp. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.70, 2003. Suplemento 3. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 16., 2003, São Paulo. Resumo. 1CDROM. 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.

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

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

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. 2011.

CURRAN, J. et al. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. **Mycology Research**, n. 98, v. 5, p. 547-552, 1994.

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 MURO, M. A. et al. 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. Evaluation of 2nd order effects on the seismic performance of RC framed structures: A fragility analysis. In: 13th World Conference on Earthquake Engineering, August 1-6, 2004, Vancouver, B.C., Canada, **Paper No. 428.**

DEAN, R. A. Signal pathways and appressorium morphogenesis . **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 35, p. 211-234, 1997.

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. **Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*.** 2003. 111f. Tese (Doutorado) - Universidad de Ruperto, Carola de Heidelberg, Alemanha, 2003.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. (2005) Arlequin v. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evol Bioinform** 1:47–50

EMBRAPA–Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnológicos. **Coleção de fungosentopatogênicos 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. et al. 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.

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.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology** 14:2611-2620.

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

FERNANDES, E. K. K. et al. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, v. 98, n. 4, p. 324-332, 2006.

FERNANDES, E. K. K. et al. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal Invertebr Pathol**, v. 98, p. 69–78, 2008.

FIGUEIREDO, E.T.L. 1997. **Entomopatogénios e bio-insecticidas**. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. ISA/UTL. Lisboa.

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)**. 1985. 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 asetus* (Chant) (Acari, Phytoseiidae). **Journal Applied Entomol.**, v. 121, p. 435-439, 1997.

FOURNIER, A. et al. 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.

FRANCESCHINI, M. **Envolvimento de Protease PR1A na patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e na infecção do carrapato *Boophilus microplus***. 2005. Tese (Doutorado)-Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GALLO, D. et al. 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.

GASSEN, M.H. **Patogenicidade de fungos entomopatogênicos para o psílídeo da goiabeira *Triozoida* 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.

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

GILLESPIE, J.P.; BATEMAN, R.; CHARNLEY, A.K. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locusts, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.128-137, 1998.

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.; INWOOD, A. J. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* ssp. from New Zealand. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 2, p. 250-256, 1998.

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

GLARE, T. R. et al. *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. Safety of non-target and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415–2457. 2007.

GOLDSTEIN, D. B. et al. 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) (Lepidoptera: Crambidae) em condições de campo e laboratório. **Agropecuária Técnica**, v. 1, n. 1, p. 24-31, 1980.

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.

HASTUTI, B.S., GLARE, T.R. AND CHAPMAN, R.B., 1999. Susceptibility of life stages of *Paropsis charybdis* to *Beauveria bassiana*. Proc. 52 nd NZ **Plant Prot. Conf.** (this volume).

HAUBOLD, B.; HUDSON. R. R. Lian 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. **Bioinformatics**, 16:847–848, 2000.

HUANG, B. et al. Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae). **Mycotaxon**, v. 94, p 137–147, 2005a.

INGLIS, G. D. et al. 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. 2011.

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. et al. The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. **FEBS J**, v. 273, p. 4603–4615, 2006.

KANZOK, S. M.; JACOBS-LORENA, M. 2006. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. **Trends in Parasitol** 22: 49-51.

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. Disponible em: <<http://vertigo.revues.org/4091>> Acesso em: 02 jul. 2011.

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.

- LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribierão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92p.
- 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. et al. 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.; LIMA J.O. G. Massa de ovos de *Diatraea saccharalis* (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.; BOTELHO P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA B.S. BENTO J.M.S. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Ed. Manole, SP. 609p. 2002
- LIU, Z. Y. et al. 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.; et al. A new species of *Beauveria*, the anamorph of *Cordyceps sobolifera*. **Fungal Diversity**, v. 7, p. 61–70, 2001.
- LIU, Z. Y. et al. *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. et al. 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 (Rapid e Aflp). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 56-60. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/marcadores.pdf>> Acesso em: 25 set. 2011.
- 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.

LOUREIRO, E. de S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; PESSOA, L. G. A. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p.469-472, 2005b.

LUZ C.; TAI M. H. H.; SANTOS A. H.; ROCHA L. F. N.; ALBERNAZ D. A. S.; SILVA H. H. G. 2007. Ovicidal activity of entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* under laboratory conditions. **J Med Entomol** 44: 799-804.

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/Agrofitl, 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. 2011.

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

MARTINY, J. B. H.; BOHANNAN, B. J. M.; BROWN, J. H.; COLWELL, R. K.; FUHRMAN, J. A et al. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:102-112.

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. et al. 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. **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*. **Transactions 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://orprints.org/14345/1/D5_2_final.pdf> Acesso em: 21 set. 2011.

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

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

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. McGiloway (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.

PARRA J.R.P. et al. **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.

- PATERNIANI, E. Agricultura sustentável nos trópicos. **Estudos Avançados**, v.15, n.43, 2001.
- 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.
- 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 Society** 10: 28 – 45.
- 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.
- PINTO, A. S. 2006. Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho, **Biocontrol**, 64p.
- 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**, Ed 33, p.14-17, 2004.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155:945-959
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos Volume II - 1a. ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2003. v. 2. 222 p.
- RAFALSKI, D. J. A. et al. Generating and using DNA markers in plant. In: BIRREN, B.; LAI, E. Non-mammalian genomic analysis: a practical guide. New York: Academic, 1996. p.75-134.
- RAMPELOTTI, F. T. et al. 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. et al. 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.; 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.

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

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.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C. Two new *Beauveria* spp. from South America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p.93-97, 1982.

SAMSON, R. A. ; EVANS, H. C. LATGÉ J.P. **Taxonomy of entomopathogenic. Atlas of Entomopathogenic Fungi**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. 187

SAMUELS, R.I.; CORACINI, D.L.A.; 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.

SCHOLTE E. J.; KNOLS B. G. J.; SAMSON R. A.; TAKKEN W. 2004a. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **J Insect Sci** 4: 1-24

SCHOLTE E. J.; NG'HABI K.; KIHONDA J.; TAKKEN W.; PAAIJMANS K.; ABDULAA S.; KILLEEN G. F.; KNOLS B. G. J. 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malarian mosquitoes. **Sci** 308: 1641-1642.

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.

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.

SEGRS, 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.

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

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

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_ACUCAR_O_PET_AGRONOMIA_UFRPE_E_O_AGRONEGOCIO_NUMA_ACAO_DE_EXTENSAO.pdf Acesso em 26 de abril.2010.

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.

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

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2006. 66p. Embrapa Soja, Circular Técnica, 30.

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, p. 289-370, 1998.

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. et al. 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.

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-simplesequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. **Applied Entomology and Zoology**, v. 42, p. 563-571, 2007.

TAMAI, M. A. et al. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 77-84, 2002

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 *Metarhizium 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.; TYPAS, M. A.; BUTT, T. M. Detection and characterization of Pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 213:251-255, 2002.

WANG, C.; GAN, H.; ST LEGER, R. J. Differential gene expression by *Metarhizium 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. 1972. *Beauveria* Vuill. In: *Nemoci hmyzu*. Naklad. Ceskoslov. Akademie, Praha, pp. 361-377.

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. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. N 147 p.

XAVIER, L.M.S.; ÁVILA, C.J. Patogenicidade, DL50 e TL50 de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para o percevejo castanho das raízes *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae). **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.763-768, 2005.

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

ZAPPELINI, 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.**, São Paulo, v.77, n.1, p.75-82. 2010.