



PATRICIA VIEIRA TIAGO

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE
DA CIGARRINHA-DA-RAIZ DA CANA-DE-AÇÚCAR *Mahanarva fimbriolata*
(HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

**Recife
Fevereiro/2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE
DA CIGARRINHA-DA-RAIZ DA CANA-DE-AÇÚCAR *Mahanarva fimbriolata*
(HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

PATRICIA VIEIRA TIAGO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Fungos de Interesse Agrônomo

Orientadora: Elza Áurea de Luna Alves Lima

Co-orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

**Recife
Fevereiro/2011**

Tiago, Patricia Vieira

Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* para o controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) / Patricia Vieira Tiago. – Recife: O Autor, 2011.

93 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Elza Áurea de Luna Alves Lima

Co-Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

CCB. Biologia de Fungos, 2011.

Inclui bibliografia

- 1. Fungos entomopatogênico 2. Pragas – Controle biológico**
- 3. Cana-de-açúcar I. Título.**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-109

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE
DA CIGARRINHA-DA-RAIZ DA CANA-DE-AÇÚCAR *Mahanarva fimbriolata*
(HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

PATRICIA VIEIRA TIAGO

Data da defesa: 21-02-11.

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof^a Dr^a Elza Áurea de Luna Alves Lima (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Universidade de São Paulo

Prof^a Dr^a Cristina Maria de Souza Motta
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Laíse de Holanda Cavalcanti Andrade
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

MEMBROS SUPLENTES

Prof^a Dr^a Elaine Malosso
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro
Universidade Católica de Pernambuco

A Jorge Luiz Schirmer de Mattos, meu amor e companheiro, pelo amor, cumplicidade e paciência e aos meus pais Maria do Carmo Vieira Tiago e Geraldo da Silva Tiago pela vida, educação e pelo apoio em minhas escolhas.

À prof^a Elza Áurea de Luna Alves Lima,
minha homenagem.

“A ciência não tem a verdade, mas aceita algumas verdades transitórias, provisórias, em um cenário parcial onde os humanos não são o centro da natureza, mas elementos dela. O entendimento dessas verdades e, portanto, a não crença nelas tem uma exigência: a razão. É o raciocínio, isto é, o uso da razão, a exigência fulcral para o conhecimento. Os paradigmas de qualquer conhecimento científico são constantemente postos à prova e substituídos quando deixam de oferecer explicações convincentes” (Attico Chassot).

Agradecimentos

À profª Drª Elza Áurea de Luna Alves Lima pela orientação, amizade e alegria. Admiro sua espontaneidade e generosidade.

À profª Drª Neiva Tinti de Oliveira pela orientação e amizade.

Aos professores Dr. João Lúcio de Azevedo, Drª Cristina Maria de Souza Motta, Drª Laíse de Holanda Cavalcanti Andrade, Drª Janete Magali de Araújo, Drª Elaine Malosso e Drª Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro, membros da banca examinadora, pela contribuição dada ao trabalho.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À chefia e aos funcionários do Departamento de Micologia.

À profª Drª Elaine Malosso pela colaboração nas atividades referentes à técnica DGGE.

Ao prof. Dr. Paulo Jorge Parreira dos Santos, do Departamento de Zoologia (UFPE), pela contribuição na análise estatística ANCOVA.

À Drª Milena Luna Alves Lima, da empresa BIOGENOMIKA (UFPR), pela contribuição na análise estatística AMOVA.

Ao Dr. David Bousfield, Ganesha Associates, Cambridge (Reino Unido), pela análise crítica e correções do inglês de um dos artigos.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pelo fornecimento de mudas de cana-de-açúcar.

À Usina Cruangi pela autorização e suporte oferecido na coleta de solo. Meus agradecimentos também ao apoio dos alunos Danielle Karla Alves da Silva e Inácio Pascoal do Monte Junior do Laboratório de Micorrizas.

Aos colegas de turma: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, Inaldo Ferreira, Jadergudson Pereira, Michellini Sivério, Polyanna Nunes Herculano, Reginaldo Gonçalves de Lima Neto e Rita de Cássia Miranda. Um agradecimento especial a Mariele Porto Carneiro Leão pela amizade e contribuição na execução de algumas atividades.

Aos colegas do Laboratório de Citologia e Genética de Fungos: Ana Lúcia Sabino

de Melo, Carlos Clean Freire do Nascimento, Dianny Carolyne Vasconcelos da Silva, Jadson Diogo Pereira Bezerra, Leandro Paulo dos Santos e Vrgnia Michelle Svedese. Em especial  prof^a Dr^a Laura Mesquita Paiva pelo apoio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Fungos: José Helton Vasconcelos Arcoverde, Maria Aparecida da Silva, Marilele Porto Carneiro Leão, Nelson Correia Lima Júnior, Phelipe Manoel Oller Costa e Rodrigo Assunção de Holanda.

Ao meu esposo Jorge Luiz Schirmer de Mattos pelo apoio e sugestões ao longo da execução deste trabalho.

Aos meus pais Maria do Carmo Vieira Tiago e Geraldo da Silva Tiago, aos irmãos Leandro Vieira Tiago e Rodrigo Vieira Tiago, as cunhadas Fátima Oliveira e Ivone Bondezan e as minhas queridas sobrinhas Gabrieli Bondezan Tiago e Heloyse Bondezan Tiago, pelo carinho e presença em minha vida mesmo a distância.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL: Os objetivos do trabalho foram analisar os aspectos morfológicos e moleculares de isolados de *Metarhizium anisopliae* e identificá-los ao nível de variedade, utilizando iniciadores específicos, selecionar isolados com alta patogenicidade para ninfas de *Mahanarva fimbriolata*, verificar a persistência no solo do isolado mais eficiente em condições de laboratório e o efeito da introdução deste fungo na estrutura da comunidade fúngica, por meio do perfil de bandas de PCR-DGGE. Foram utilizadas as seguintes metodologias: técnica de cultura sob lamínula, PCR, bioensaios, contagem de colônias em placa e PCR-DGGE. A amplificação com os iniciadores ITSmet/ITS4 confirmou que os isolados são *M. anisopliae* var. *anisopliae*. As análises morfológicas e moleculares demonstraram a grande variabilidade intraespecífica entre os 37 isolados estudados e serviram de base para a diferenciação destes isolados que apresentam mesma origem geográfica e o mesmo hospedeiro. Os iniciadores (GACA)₄ e (GTG)₅ forneceram DNA *fingerprints* para um maior número de isolados. Baseada na curva de mortalidade confirmada, entre nove isolados, URM5946, URM5951 e URM6033 foram considerados os melhores para serem utilizados em um programa de controle biológico de *M. fimbriolata*. Entre estes isolados, o URM5951 foi avaliado quanto a sua persistência e efeito na comunidade fúngica após sua aplicação no solo. Este isolado permaneceu viável até 60 dias do experimento e demonstrou não interferir na comunidade fúngica do solo em que foi introduzido. Todas as características estudadas são desejáveis no processo de seleção de isolados de *M. anisopliae* e os resultados obtidos reforçam a importância da utilização destes fungos como agentes de controle biológico da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *M. fimbriolata*.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos, controle biológico, marcadores moleculares, PCR-DGGE, comunidade fúngica do solo.

ABSTRACT: Our objectives were to analyze the morphological and molecular characteristics of isolates of *Metarhizium anisopliae* and identify them the level of variety using specific primers, select isolates with high pathogenicity against nymphs of *Mahanarva fimbriolata*, verify the persistence in the soil of isolate most effective in laboratory conditions and the effect of its introduction on the fungal community structure, through the band profile of PCR-DGGE. We used the following methodologies: coverslip culture technique, PCR, bioassays, count the colonies on the plates and PCR-DGGE. The amplification with primers ITSmet/ITS4 confirmed that the isolates are *M. anisopliae* var. *anisopliae*. The morphological and molecular analysis demonstrated the great intraspecific variability among 37 isolates and provided a basis for differentiation of these isolates with the same geographical origin and host. Primers (GACA)₄ and (GTG)₅ provided DNA fingerprints for a larger number of isolates. Based on the confirmed mortality curve, among nine isolates, URM5946, URM5951 and URM6033 were considered to be potentially the most effective in a biological control program for *M. fimbriolata*. Among these isolates, the URM5951 was evaluated its persistence and effects on soil fungal community after its application. This isolate remained viable until 60 days of the experiment and shown not to interfere in the soil fungal community in which it was introduced. All characteristics are desirable in the selection of isolates of *M. anisopliae* and the results reinforce the importance of using these fungi as biological control agents of the sugarcane root spittlebug, *M. fimbriolata*.

Key-words: entomopathogenic fungi, biological control, molecular markers, PCR-DGGE, soil fungal community.

Lista de figuras

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	Página
Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Mahanarva fimbriolata</i> . Fonte: Mendonça & Mendonça (2005).....	19
Figura 2 - Estrutura do agregado gênico que codifica RNA ribossômico. Fonte: Fungaro (2000).....	26
Figura 3 - (a) Estrutura secundária de um <i>intron</i> do grupo I; (b) processo de autorremoção do <i>intron</i> . Fonte: Haugen et al. (2005).....	27
Figura 4 – Esquema de mobilidade eletroforética do DNA em um gel com gradiente desnaturante, tipo DGGE, ao longo de intervalos de tempo (T1, T2 e T3). Fonte: Xavier et al. (2004).....	33
ARTIGO 1 - POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> BASEADO NOS MARCADORES MOLECULARES ITS-RFLP, ISSR e ISSP	
Figura 1 - Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA obtidos com as enzimas <i>DraI</i> , <i>PstI</i> (a); <i>MspI</i> (b); <i>AluI</i> (c); <i>EcoRI</i> (d); <i>HaeIII</i> (e); <i>HinfI</i> (f); <i>Bsh1236I</i> (g). Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas de 1 a 37 representam isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> . Na pista 38, <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> URM 4412.....	40
Figura 2 - Dendrograma de similaridade genética de 37 isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> a partir dos produtos de amplificação do iniciador (GACA) ₄ . URM4412: <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> . r = 96,10%. Grupo 1: URM6132, URM6115; Grupo 2: URM6035, URM6129, URM5947, URM6110; Grupo 3: URM5946, URM5948, URM6034, URM5952, URM5949, URM6096, URM5951, URM6033, URM6108, URM6105, URM6097, URM6114, URM6128, URM6103, URM5950, URM6111, URM6099, URM6130, URM6100, URM6113, URM6101, URM6102.....	42

Figura 3 - Dendrograma de similaridade genética de 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a partir dos produtos de amplificação do iniciador (GTG)₅. URM4412: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. $r = 96,39\%$. Grupo 1: URM6129, URM6110, URM5948, URM6115, URM6132, URM6131, URM6210, URM6034, URM6097, URM6098, URM6128, URM5952, URM5951, URM6096, URM6099, URM6107, URM6100, URM6113, URM6101, URM6102, URM6103, URM6114, URM5949, URM6105; Grupo 2: URM5946, URM5947, URM6130, URM6111, URM5950, URM6109; Grupo 3: URM6133, URM6033.....

43

Figura 4 - Dendrograma de similaridade genética de 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a partir dos produtos de amplificação do iniciador M13. URM4412: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. $r = 98,80\%$. Grupo 1: URM6106, URM6112, URM5946, URM6115, URM6132, URM6096, URM6210, URM6033, URM6108, URM6107, URM6097, URM5951, URM6128, URM6109, URM5950, URM6111, URM6099, URM6130, URM6100, URM6113, URM6101, URM6102, URM6103, URM6114, URM6104, URM6105, URM5949, URM5952, URM6034, URM5948, URM6131; Grupo 2: URM6035, URM6110, URM6133; Grupo 3: URM6129, URM5947, URM6098.....

44

Figura 5 - Dendrograma de similaridade genética de 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a partir dos produtos de amplificação do iniciador EI1. URM4412: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. $r = 98,25\%$. Grupo 1: URM6106, URM5946, URM5947, URM6115, URM6132, URM6096, URM6210, URM6101, URM6097, URM6098, URM6109, URM6099, URM6130, URM5950; Grupo 2: URM6129, URM6131; Grupo 3: URM6112, URM6035, URM6110, URM5948, URM6107, URM6034, URM5951, URM6033, URM6108, URM6128, URM5952, URM5949, URM6113, URM6102, URM6103, URM6105, URM6104, URM6100, URM6114, URM6111.....

45

ARTIGO 2 - PATOGENICIDADE DIFERENCIAL DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* E O CONTROLE DA CIGARRINHA-DA-RAIZ DA CANA-DE-AÇÚCAR *Mahanarva fimbriolata*

Figura 1 - Mortalidade acumulada confirmada (%) de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* ao longo de seis dias após aplicação de isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. a) Bioensaio 01: ---◆--- URM5946; —■— URM6034; —▲— URM5952. b) Bioensaio 02: —■— URM5948; ---▲--- URM5949; —■— URM5950; -◆- URM5947. c) Bioensaio 03: ---■--- URM5951; —◆— URM6033. Dados originais; para análise estatística foram transformados em $\text{ARCSEN} \sqrt{(x/100)}$

53

Figura 2 - Mortalidade acumulada corrigida (%) de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* ao longo de seis dias após aplicação de isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. a) Bioensaio 01: ---◆--- URM5946; —■— URM6034; —▲— URM5952. b) Bioensaio 02: ---▲--- URM5949; —◆— URM5947; —■— URM5948; —■— URM5950. c) Bioensaio 03: ---■--- URM5951; —◆— URM6033. Dados originais; para análise estatística foram transformados em $\text{ARCSEN} \sqrt{(x/100)}$

55

ARTIGO 3 – PERSISTÊNCIA E EFEITO DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE FÚNGICA DO SOLO

Figura 1- Estrutura da comunidade fúngica com base nos perfis de fragmentos do rDNA 18S de amostras de solo após 15 dias de aplicação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM5951. a – dendrograma de similaridade genética obtido pela análise de DGGE, $r = 99,28\%$; b – Perfil eletroforético de DGGE. Na pista M, marcador de peso molecular 1 Kb; Nas pistas MET1, MET2, MET3, MET4, MET5, MET6, MET7 = réplicas das amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae*; MET = DNA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 = amostras de solo do controle; B = branco.....

64

Figura 2 – Estrutura da comunidade fúngica com base nos perfis de fragmentos do rDNA 18S de amostras de solo após 30 dias de aplicação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM5951. a – dendrograma de similaridade genética obtido pela análise de DGGE, $r = 97,89\%$; b – Perfil eletroforético de DGGE. Na pista M, marcador de peso molecular 1 Kb; Nas pistas MET1, MET2, MET3, MET4, MET5, MET6, MET7 = réplicas das amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae*; MET = DNA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 = amostras de solo do controle; B = branco.....

65

Figura 3 – Estrutura da comunidade fúngica com base nos perfis de fragmentos do rDNA 18S de amostras de solo após 60 dias de aplicação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM5951. a – dendrograma de similaridade genética obtido pela análise de DGGE, $r = 99,20\%$; b – Perfil eletroforético de DGGE. Na pista B = branco; Na pista M = marcador de peso molecular 1 Kb; Nas pistas MET1, MET2, MET3, MET4, MET5, MET6, MET7 = réplicas das amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae*; MET = DNA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 = amostras de solo do controle..... 66

Figura 4 – Estrutura da comunidade fúngica com base nos perfis de fragmentos do rDNA 18S de amostras de solo após 90 dias de aplicação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM5951. a – dendrograma de similaridade genética obtido pela análise de DGGE, $r = 99,87\%$; b – Perfil eletroforético de DGGE. Na pista M, marcador de peso molecular 1 Kb; Nas pistas MET1, MET2, MET3, MET4, MET5, MET6, MET7 = réplicas das amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae*; MET = DNA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 = amostras de solo do controle; B = branco..... 67

ARTIGO 4 - MORFOLOGIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*

Figura 1 - Apressórios de *Metarhizium anisopliae*. a) isolado URM6110 120h (47,7x); b) isolado URM5946 48h (46x)..... 72

Figura 2 - Microestruturas de *Metarhizium anisopliae*. a) primórdio de conídio (seta), isolado URM6115 48h (47,7x); b) conidióforo simples (seta), isolado URM6115 48h (47,7x); c) conidióforo jovem, isolado URM6110 120h (46x)..... 73

Figura 3 - Conidióforos ramificados e conídios cilíndricos de isolados de *Metarhizium anisopliae* com 120 h. a) isolado URM6113 (46x); b) isolado URM6112 (46x); c) isolado URM5947 (47,7x); d) isolado URM5947 (44,7x)..... 74

Figura 4 - Características morfológicas macroscópicas de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> em meio BDA após 15 dias de incubação, originados de <i>Mahanarva fimbriolata</i> , no município de Tangará da Serra-MT. 01 – URM5946; 02 – URM5947; 03 – URM5948; 04 – URM5949; 05 – URM5950; 06 – URM5951; 07 – URM5952; 08 – URM6033; 09 – URM6034; 10 – URM6035; 11 – URM6096; 12 - URM6097; 13 - URM6098; 14 – URM6100; 15 – URM6101; 16 – URM6102; 17 – URM6103; 18 – URM6104; 19 – URM6105; 20 – URM6106; 21 - URM6107; 22 – URM6108; 23 – URM6109; 24 – URM6110; 25 – URM6111; 26 – URM6112; 27 – URM6113; 28 – URM6114; 29 – URM6128; 30 – URM6129; 31 – URM6130; 32 – URM6131; 33 – URM6132; 34 – URM6133; 35 – URM6210.....	75
Figura 5 - Amplificação com o par de iniciadores ITSmet/ITS4, específicos para <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> . M: marcador de peso molecular 100 pb. 1 – 37: isolados de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> ; 38: <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> URM 4412.....	76

Lista de tabelas

ARTIGO 1 - POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> BASEADO NOS MARCADORES MOLECULARES ITS-RFLP, ISSR e ISSP	Página
Tabela 1 - Análise de variância molecular (AMOVA) dos marcadores ISSR e ISSP para 37 isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e 1 isolado de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> . A porcentagem de variação entre os grupos (FST) e dentro dos grupos (FSC) é apresentada, considerando tanto os marcadores em conjunto, quanto em separados.....	46
ARTIGO 3 - PERSISTÊNCIA E EFEITO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE FÚNGICA DO SOLO	
Tabela 1 - Análise físico-química do solo coletado na Usina Cruangi, Timbaúba-PE	60
Tabela 2 - Persistência de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> URM5951 no solo após 15, 30, 60 e 90 dias de aplicação.....	63

Lista de Quadros

ARTIGO 4 - MORFOLOGIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* Página

Quadro 1 - Microestruturas de isolados de *Metarhizium anisopliae* as 48, 72, 96 e 120 h de crescimento em meio BDA..... 76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 Biologia de <i>Mahanarva fimbriolata</i> e danos econômicos.....	18
2.2 Controle microbiano de insetos-praga.....	19
2.3 Caracterização molecular.....	24
2.4 Seleção de fungos entomopatogênicos.....	29
2.5 Ecologia de <i>Metarhizium anisopliae</i> no solo.....	31
3. ARTIGO 1: POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> BASEADO NOS MARCADORES MOLECULARES ITS-RFLP, ISSR e ISSP.....	35
Resumo.....	35
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	36
- Isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e extração do DNA.....	36
- Amplificação da região ITS do rDNA.....	37
- ITS-RFLP – locus ITS1 - 5.8S - ITS2 do rDNA.....	37
- ISSR.....	38
- ISSP.....	38
- Análise dos dados moleculares.....	39
Resultados.....	39
Discussão.....	46
4. ARTIGO 2: PATOGENICIDADE DIFERENCIAL DE <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> E O CONTROLE DA CIGARRINHA-DA-RAIZ DA CANA-DE-AÇÚCAR <i>Mahanarva fimbriolata</i>	49
Resumo.....	49
Introdução.....	49

Material e Métodos.....	50
- Procedência dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	50
- Coleta das ninfas de <i>Mahanarva fimbriolata</i> para realização dos bioensaios....	50
- Bioensaios para avaliação da patogenicidade dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> x <i>Mahanarva fimbriolata</i>	50
- Análise estatística.....	51
Resultados.....	52
Discussão.....	56
5. ARTIGO 3: PERSISTÊNCIA E EFEITO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE FÚNGICA DO SOLO.....	58
Resumo.....	58
Introdução.....	58
Material e Métodos.....	59
- Procedência do isolado de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	59
- Coleta do solo.....	60
- Avaliação da persistência de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> no solo...	60
- Análise da estrutura da comunidade fúngica do solo por PCR-DGGE	61
- Análise estatística.....	62
Resultados e Discussão.....	62
6. ARTIGO 4: MORFOLOGIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>Metarhizium anisopliae</i>	69
Resumo.....	69
Introdução.....	69
Material e Métodos.....	71
Resultados e Discussão.....	71
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar destaca-se na agricultura brasileira como matéria-prima para o uso das famílias agricultoras e da indústria sucro-alcooleira. No primeiro caso, a produção destina-se à alimentação de animais e extração da sacarose para uso das famílias agricultoras (Margarido et al., 2005), enquanto a produção em larga escala visa à exportação de açúcar e ao programa nacional de biocombustível (Alves et al., 2008a). A cigarrinha-da-raiz *Mahanarva fimbriolata* Stal (Hemiptera: Cercopidae) é uma importante praga desta cultura nas principais regiões produtoras do País (Dinardo-Miranda et al., 2006).

O método normalmente empregado para o controle da cigarrinha-da-raiz baseia-se no uso de defensivos agrícolas, embora seja crescente a conscientização de seu impacto ambiental e da necessidade de alternativas ecologicamente viáveis. Outro método utilizado para o controle deste inseto é a aplicação do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. A cultura da cana-de-açúcar é o setor agrícola que mais emprega micoinseticida no Brasil com benefícios relacionados à redução de inseticidas químicos (Alves et al., 2008a). Outro aspecto positivo do uso de *M. anisopliae* é a diminuição dos danos causados pela broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* Fabricius, em função do parasitismo desse fungo e da ação de outros inimigos naturais (Mendonça et al., 1996).

A variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos pode ser considerada uma das principais vantagens no controle microbiano de insetos (Alves, 1998a) e pode ser detectada e observada por meio dos estudos morfológicos, bioquímicos, de patogenicidade e de marcadores moleculares. No último caso, poderão ser detectadas diferenças no DNA que irão auxiliar na compreensão da diversidade genética e da estrutura das populações de fungos. Alguns estudos foram realizados, a fim de se detectar o polimorfismo em fungos (Oliveira et al., 1997; Mavridou & Typas, 1998; Lima, 2005; Velásquez et al., 2007), visto que eles poderão auxiliar no controle de qualidade de micoinseticidas, proteção de patente, monitoramento ambiental e persistência do produto (Hegedus & Khachatourians, 1996).

A patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* já foi testada contra *M. fimbriolata*,

utilizando isolados que apresentaram eficiência igual ou superior a 70% de mortalidade confirmada (Loureiro et al., 2005), e também por isolados que foram considerados mais patogênicos por apresentarem mortalidade corrigida entre 46,5 e 59,7% (Macedo et al., 2006). A persistência de *M. anisopliae* no solo e seu possível efeito na estrutura da comunidade microbiana deste solo são características importantes que devem ser consideradas no processo de seleção de isolados para o controle biológico de insetos. Alguns estudos investigaram a persistência de *M. anisopliae* de acordo com o tipo e compactação do solo, temperatura e umidade (Lanza et al., 2004; Guerra et al., 2009). O efeito da introdução de fungos entomopatogênicos na comunidade microbiana do solo é um aspecto pouco estudado, sendo observado que a presença do fungo *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch no solo causou pouco e transitório efeito na comunidade fúngica deste solo (Schwarzenbach et al., 2009).

A seleção dos isolados de *M. anisopliae* proporcionará a obtenção de isolados que apresentem características adequadas para utilização em programas de controle biológico de pragas como as cigarrinhas, insetos que causam danos a várias culturas em muitos estados brasileiros. Estes programas são importantes visto que hoje existe uma tendência em reduzir o uso de agrotóxicos na produção de alimentos. Portanto, a pressão crescente da sociedade por alimentos mais saudáveis, a conscientização das adversidades causadas pelo uso abusivo e inadequado de agrotóxicos, e a expansão da agricultura orgânica são alguns fatores que vêm exigindo dos pesquisadores um maior empenho na elaboração de programas de controle biológico. Os objetivos deste trabalho são analisar os aspectos morfológicos e moleculares de isolados de *M. anisopliae* e identificá-los ao nível de variedade utilizando iniciadores específicos, selecionar isolados com alta patogenicidade para ninfas de *M. fimbriolata*, verificar a persistência no solo do isolado mais eficiente em condições de laboratório e o efeito da introdução deste fungo na estrutura da comunidade fúngica, por meio do perfil de bandas de PCR-DGGE.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biologia de *Mahanarva fimbriolata* e danos econômicos

A cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *M. fimbriolata* Stal (Hemiptera: Cercopidae) possui as fases de ovo, ninfa e adulto (Figura 1). As fêmeas depositam ovos no solo, na base das touceiras ou entre resíduos vegetais, preferencialmente nas linhas da cana, podendo também ser depositados nas entrelinhas, principalmente se estiverem cobertas de palhas. O período de incubação dos ovos é de 15 a 20 dias, mas a diminuição das chuvas causa deficiência hídrica no solo e pode provocar a ocorrência de diapausa nos ovos, garantindo a sobrevivência da espécie em condições desfavoráveis. No ano seguinte, com o início das primeiras chuvas, os ovos, em diapausa, iniciarão o processo fisiológico de extrusão, dando continuidade ao desenvolvimento embrionário, eclodindo as ninfas. Essas se fixam às raízes e radículas da cana-de-açúcar, onde permanecerão de 30 a 40 dias cobertas por uma espuma branca de alta densidade, por elas secretadas. Neste período, as ninfas passam por cinco mudas ou ecdises, originando os adultos que apresentam longevidade de 12 a 20 dias. Assim, o ciclo biológico completo, sem envolver o período em que os ovos possam passar por diapausa, é de dois a três meses (Mendonça & Mendonça, 2005).

Geralmente *M. fimbriolata* desenvolve três gerações anuais, nos meses de setembro a março nas Regiões Sul, Sudeste e Norte do Brasil e nos meses de março a agosto na Região Nordeste (Mendonça & Mendonça, 2005). As ninfas, ao se alimentarem, ocasionam uma “desordem fisiológica” em decorrência de suas picadas que, ao atingirem os vasos lenhosos da raiz, os deterioram, impedindo ou dificultando o fluxo de água e de nutrientes. A morte das raízes ocasiona desequilíbrio na fisiologia da planta, caracterizada pela desidratação do floema e xilema, afinamento e posterior aparecimento de rugas na superfície externa. Os adultos, ao injetarem toxinas, produzem pequenas manchas amarelas nas folhas que com o passar do tempo tornam-se avermelhadas e, finalmente, opacas, reduzindo sensivelmente a capacidade de fotossíntese das folhas e o conteúdo de sacarose no colmo (Almeida, 2003). O resultado é o afinamento e atrofia do colmo e dos entrenós, redução da sacarose no colmo e grandes perdas econômicas em todo o processo produtivo.

Perdas agrícolas e industriais foram superiores a 60% em canaviais dos estados de Sergipe em 1994 e da Bahia em 1996 (Mendonça, 1996), enquanto no estado de São Paulo, para as colheitas de agosto e outubro (safra 1997/1998) foram verificadas perdas de 42,2% (65,2 t/ha) e de 44,8% (64,8 t/ha), respectivamente (Dinardo-Miranda et al., 1999). O nível de dano econômico da cigarrinha-da-raiz foi estimado entre dois e três insetos m^{-1} (Dinardo-Miranda et al., 2008). Peixoto et al. (2009) verificaram que para cada ninfa por metro linear ocorre perda relativa de 2,3% toneladas de cana por hectare.

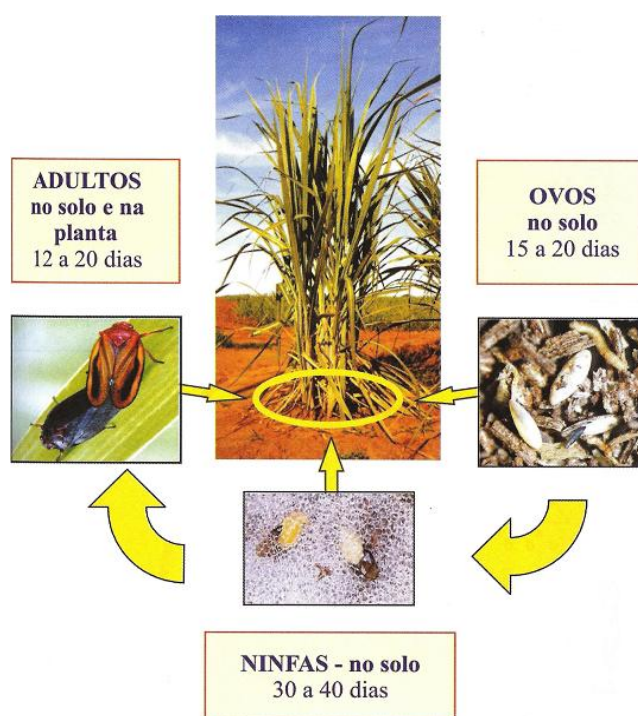


Figura 1 - Ciclo biológico de *Mahanarva fimbriolata*. Fonte: Mendonça & Mendonça (2005).

2.2 Controle microbiano de insetos-praga

O método normalmente empregado para o controle das cigarrinhas baseia-se no uso de defensivos agrícolas. O controle químico é pouco eficiente para ninfas de *M. fimbriolata*, pois estas se localizam no solo, junto às touceiras e protegidas pela espuma branca. Para esta fase, as aplicações devem ser dirigidas diretamente à base das touceiras e entrelinhas da cultura, utilizando equipamentos como os pulverizadores costal manual, motorizado ou pressurizado (Loureiro, 2004). A baixa eficiência desses defensivos gera a necessidade de sucessivas aplicações, inviabilizando economicamente a produção e causando enormes prejuízos ambientais (Leite et al., 2002).

O controle biológico consiste na introdução de um organismo benéfico, uma espécie predatória ou parasítica, em um sistema de cultivo onde este agente estava ausente ou em baixo nível populacional. Esta prática irá pressionar negativamente a população de uma determinada presa ou hospedeiro que foi capaz de atingir níveis de praga ou doença (Gliessman, 2001). O aumento da suscetibilidade a pragas é geralmente reflexo das diferenças na saúde da planta, causadas pelo mau manejo da fertilidade do solo (Nicholls & Altieri, 2007). Um dos objetivos do controle biológico é que o organismo benéfico introduzido seja capaz de completar todo o seu ciclo de vida e se reproduzir em um número suficiente para se tornar um residente permanente do agroecossistema. Mas, freqüentemente, as condições do nicho onde os organismos benéficos foram introduzidos podem não satisfazer estas exigências a longo prazo, sendo necessária uma reintrodução do agente de controle biológico (Gliessman, 2001). Portanto, para que o controle biológico seja bem sucedido, são necessárias mudanças nas práticas produtivas e no uso de insumos. O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é uma alternativa à estratégia de intervenção unilateral com o agroquímico, tendo um enfoque mais profundo sobre a ecologia, dos insetos e das plantas, com base no uso de táticas complementares, como a adoção de métodos culturais que favoreçam a diversidade vegetal. Nesta abordagem, o controle das pragas deve ser baseado inicialmente nos fatores naturais, tais como patógenos, parasitas e predadores deixando o manejo com uso de agrotóxicos como último recurso. Mas como os métodos biológicos de controle de pragas não se prestam de imediato ao sistema agroindustrial, para produção e comercialização em larga escala, como ocorre com os agrotóxicos, as empresas privadas relutam em incorrer em despesas para o seu desenvolvimento. Entretanto, a escassez de energia, a degradação ambiental e a inflação mostram que o ganho financeiro imediato não deveria constituir a principal força motriz da agricultura (Altieri, 2002). Assim apesar da forte pressão econômica sobre a agricultura, muitos produtores estão fazendo a transição para práticas que são mais consistentes ambientalmente e têm o potencial de contribuir com a sustentabilidade da agricultura a longo prazo, sendo o controle biológico um dos princípios orientadores nesse processo de conversão (Gliessman, 2001).

O controle microbiano representa um ramo do controle biológico de insetos, que consiste na utilização racional de patógenos visando à manutenção do equilíbrio da população de pragas no ambiente. Os patógenos microbianos apresentam vantagens em relação aos inseticidas químicos, pois mantêm populações de parasitas, predadores e

polinizadores, não poluem o ambiente e não são tóxicos ao homem e outros animais (Alves, 1998a). Nas culturas em que o controle microbiano é utilizado, o aumento do número de inimigos naturais é observado. O controle dos insetos-praga é obtido pela ação conjunta dos patógenos e dos inimigos naturais, representados por parasitóides, predadores, incluindo insetos, aves e outros animais (Rossi-Zalaf et al., 2008).

Pode-se citar como controle microbiano bem sucedido o uso de fungos entomopatogênicos, que apresentam grande versatilidade, causando danos aos artrópodes que vivem em plantas, solos e ambientes aquáticos. Apresentando mecanismo de infecção especializado, alguns fungos podem infectar diferentes estádios de desenvolvimento dos hospedeiros (Mccoy & Milani-Tigano, 1996). Para a maioria dos fungos a penetração ocorre via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só penetram no inseto por via oral. Além disso, possuem alta capacidade de disseminação horizontal, podendo ser levados pelos diferentes agentes de disseminação para locais distantes (Alves, 1998b).

Os principais fungos entomopatogênicos pertencem aos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Sporothrix*, *Lecanicillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Aschersonia*, *Isaria*, *Paecilomyces* e *Entomophthora* (Faria & Magalhães, 2001; Alves et al., 2008a). O gênero *Metarhizium* compreende o grupo mais estudado, e neste estão incluídas três espécies, identificadas segundo sua micromorfologia e tamanho de conídios, *M. anisopliae* (Metschnikov) Sorokin, *M. flavoviride* Gams e Rozsypal e *M. album* Petch (Bridge et al., 1993).

A taxonomia de *Metarhizium* foi reavaliada pela análise do sequenciamento de regiões do espaçador interno transcrito (ITS – *Internal Transcribed Spacer*) e de rDNA 28S e sua correlação com padrões de DNA amplificados ao acaso (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*). Esse estudo permitiu o reconhecimento de quatro grupos dentro do grupo *M. anisopliae*, correspondendo a duas variedades já descritas [*M. anisopliae* var. *anisopliae* (Metschnikov) Sorokin e *M. anisopliae* var. *majus* (Johnston) Tulloch] e duas variedades novas (*M. anisopliae* var. *acridum* Driver & Milner e *M. anisopliae* var. *lepidiotum* Driver & Milner) (Driver et al., 2000). Posteriormente, uma nova variedade foi descrita na China, *M. anisopliae* var. *dcjhyium*. Essa nova variedade, comparada a outros isolados de *M. anisopliae*, apresentou alta virulência ao cupim *Odontotermes formosanus* Shiraki e um diferente padrão de bandas de isoenzimas esterases. Os isolados também foram comparados quanto às sequências do rDNA 18S, e a

análise filogenética demonstrou que formam um grupo monofilético (Dong et al., 2007).

A taxonomia de *Metarhizium* foi novamente reavaliada, com base na análise filogenética multigênica abrangendo os genes *tef-1* (fator de elongação da transcrição 1- α), *rpb1* (subunidade maior da RNA polimerase II), *rpb2* (segunda subunidade maior da RNA polimerase II) e β -*tub* (β -tubulina). As espécies *M. brunneum* Petch, *M. guizhouense* Chen & Guo, *M. pingshaense* Chen & Guo e *M. taii* Liang & Liu eram consideradas sinônimas de *M. anisopliae*. Foram reconhecidas como espécie *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum* (Driver & Milner) Bischoff, Rehner & Humber, *M. lepidiotae* (Driver & Milner) Bischoff, Rehner & Humber e *M. majus* (Johnston) Bischoff, Rehner & Humber. Duas novas espécies foram descritas, *Metarhizium globosum* Bischoff, Rehner & Humber e *Metarhizium robertsii* Bischoff, Rehner & Humber, reconsideraram *M. brunneum* e reconheceram *M. guizhouense* (= *M. taii*) como anamorfo de *Metacordyceps taii* (Liang & Liu) Sung, Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Bischoff et al., 2009). O gênero *Metacordyceps* foi proposto por Sung et al. (2007) e inclui teleomorfos de *Metarhizium* e outros anamorfos relacionados. Estes estudos contribuem para o conhecimento da grande variabilidade genética do gênero e auxiliam os estudos taxonômicos, ao nível de espécie.

A espécie mais estudada nesse gênero é *M. anisopliae*, um anamorfo pertencente ao Filo Ascomycota, visto que o teleomorfo *Cordyceps brittlebankisoides* [= *Metacordyceps brittlebankisoides* (Liu, Liang, Whalley, Yao & Liu) Sung, Sung, Hywel-Jones & Spatafora] foi isolado de uma larva (Coleoptera: Scarabaeidae) e foi relacionado com o anamorfo *M. anisopliae* var. *majus* [= *M. majus* (Johnston) Bischoff, Rehner & Humber] (Liu et al., 2001). As estruturas reprodutivas de *M. anisopliae* (anamorfo, a forma mais comumente encontrada) são representadas por conidióforos e conídios. Os conidióforos são estruturas especializadas, hialinas, simples ou ramificadas que dão origem as fiálides, também hialinas, onde ocorre a mitose. A conidiogênese em *M. anisopliae* se enquadra no modelo fialídico, o núcleo migra da fiálide para o primórdio do conídio, este quando atinge a maturidade torna-se esverdeado e é dispersado (Luna-Alves Lima, 1989). Estruturas leveduriformes ou blastosporos e apressórios são produzidos por *M. anisopliae*, a partir da diferenciação micelial. Os blastosporos, em casos distintos, funcionam como unidades reprodutivas e são produzidos em cultura submersa (Kleespies & Zimmermann, 1998; Jackson & Jaronski, 2009) e na hemolinfa do inseto hospedeiro (Alves, 1998b). Observações citológicas em *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin indicaram que estas estruturas se originaram a partir da germinação dos conídios nas primeiras 24 horas de

cultivo em meio líquido, enquanto que na fase micelial, elas se formaram em ponta de hifas ou a partir de tubo germinativo retardatário (Luna-Alves Lima & Tigano, 1989). Esses autores verificaram que os blastosporos têm parede celular menos espessa que a dos conídios. O apressório, formado na extremidade da hifa, pode estar envolvido no mecanismo de patogenicidade do fungo, tendo a função de iniciar o processo de penetração da epicutícula e procutícula do tegumento do inseto (Alves, 1998b). Recentemente, foi assinalada a produção de microesclerócios por isolados de *M. anisopliae* após cultivo em meio líquido com diferentes concentrações de carbono e carbono-nitrogênio (Jackson & Jaronski, 2009).

A relação fungo-hospedeiro ocorre pela adesão e germinação de conídios na superfície do inseto, seguida de penetração da hifa através da cutícula. O processo de adesão depende da presença de enzimas (esterases, lipases e proteases) na superfície dos conídios não germinados que alteram a superfície do tegumento do inseto, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo (St. Leger et al., 1991). Alguns fungos sob determinadas condições formam o apressório, onde ocorre elevada atividade metabólica devido à produção de enzimas (proteases, lipases e quitinases). Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químicos, resultantes da liberação destas enzimas que facilitam a penetração mecânica. A partir da penetração, inicia-se o processo de colonização do hospedeiro, no qual a hifa que penetra sofre um espessamento e se ramifica no tegumento do inseto e na hemocela, onde são formados os blastosporos (fase parasita). Após a morte do hospedeiro, as hifas crescem invadindo os diversos órgãos internos e, posteriormente, emergem do corpo do inseto produzindo os conídios, que corresponde à fase sapróbia, que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos (Alves, 1998b).

Estudos ao nível molecular tentam descrever o processo de infecção dos hospedeiros e demonstram que este processo é complexo e multifatorial. As etapas de adesão e penetração são as mais estudadas e parecem ser decisivas no estabelecimento da infecção. Foi demonstrada a participação de uma adesina, codificada pelo gene *Mad1*, na adesão de conídios à cutícula de larvas de *Manduca sexta* Linnaeus. Esta evidência foi obtida por meio de mutantes nulos deste gene que tiveram uma diminuição na germinação dos conídios, supressão na formação dos blastosporos e redução na virulência (Wang & St. Leger, 2007a). Também foi relatada a participação das piripilinas na diferenciação dos apressórios em *M. anisopliae*, que são proteínas que circundam gotículas de lipídios no

interior da célula. O gene *Mpl1* foi desativado em algumas linhagens gerando deficiência no processo de infecção, devido à formação de apressório com menor nível de gotículas de lipídios e conseqüentemente com menor pressão osmótica, acarretando em deficiências na penetração (Wang & St. Leger, 2007b). Apressórios defeituosos também foram observados após a deleção do gene *mapka1* (subunidade catalítica 1 da proteína quinase A) (Fang et al., 2009). No processo de penetração, as proteases do tipo subtilisina são bastante estudadas, sendo dez os genes que codificam para diferentes isoformas destas enzimas (Pr1A – Pr1J) (Bagga et al., 2004), que parece apresentar uma especificidade em relação ao hospedeiro (Dutra et al., 2004). Outra proteína que está sendo estudada é a MOS1 e, possivelmente, seu papel está relacionado com a adaptação do fungo às condições de alta pressão osmótica na hemolinfa do inseto. A desativação do gene *Mos1* aumentou a sensibilidade ao estresse osmótico e oxidativo e diminuiu a formação de apressórios e a virulência ao inseto. Estes dados sugerem que possa existir uma interação da proteína MOS1 com outras proteínas, sendo necessários mais estudos para a elucidação deste fenômeno (Wang et al., 2008). Outros genes como *Mcl1* (proteína tipo-colágeno), *Cag8* (regulador da via de sinalização da proteína G), *chi2* (endoquitinase), *chi3* (endo e exoquitinase) e *Mpk1* (fosfocetolase) estão envolvidos no processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros, causando uma redução da virulência quando inativados (Wang & St. Leger, 2006; Fang et al., 2007; Staats, 2007; Boldo et al., 2009; Duan et al., 2009).

2.3 Caracterização molecular

Marcador molecular representa todo e qualquer fenótipo oriundo de um gene expresso ou de um segmento do DNA que corresponde às regiões, expressas ou não, do genoma. O desenvolvimento da biologia molecular permitiu o surgimento de diversos métodos de detecção do polimorfismo genético, diretamente ao nível do DNA, que poderão auxiliar na compreensão da diversidade genética e da estrutura das populações de fungos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Faleiro, 2007).

A reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica que possibilita a obtenção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA por meio da amplificação em ciclos. Esta técnica, aliada às metodologias de clonagem e sequenciamento do DNA, possibilitou um rápido acúmulo de informações

sobre a estrutura genômica, como a descoberta e o estudo de sequências repetitivas de DNA, uma rica fonte de polimorfismo genético (Matioli & Passos-Bueno, 2001). Baseado na PCR para a análise de polimorfismo, alguns métodos foram descritos, tais como ITS, ITS-polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (ITS-RFLP – *ITS-Restriction Fragment Length Polymorphism*), *Intron Splice Site Primer*, sequências internas simples repetidas (ISSR – *Inter Simple Sequence Repeats*) e sequências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence repeats*) (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Matioli & Passos-Bueno, 2001; Faleiro, 2007).

O DNA que codifica o rRNA apresenta-se como um agregado gênico, no qual se tem três regiões gênicas conservadas composta pelos genes 18S, 5,8S e 28S. Esses genes são separados por regiões espaçadoras intergênicas variáveis denominadas ITS1 e ITS2 (Figura 2), as quais são transcritas e processadas para originar rRNA maduro. O agregado gênico que codifica para rRNA aparece repetido centena de vezes no genoma fúngico. Este agregado apresenta algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, permitindo a análise de variações de diferentes níveis taxonômicos. Estas regiões permitem que iniciadores (*primers*) de PCR sejam desenhados e utilizados para uma ampla gama de espécies fúngicas. A região 18S é a mais conservada e por isso é utilizada apenas na comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S é a mais variável, sendo apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente sendo apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões serem flanqueadas por segmentos conservados, relativamente curtos (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permitem a amplificação e o sequenciamento com facilidade (Fungaro, 2000).

A digestão de amostras de DNA com enzimas de restrição (RFLP) pode contribuir para a detecção do polimorfismo, com base no número e tamanho dos fragmentos produzidos (Marques et al., 2002). Esta técnica permitiu diferenciar espécies e isolados de *Metarhizium* com base na presença ou ausência de sítios de restrição no rDNA (Pipe et al., 1995). Nesse estudo, isolados de *M. anisopliae* foram agrupados de acordo com a origem geográfica, mas não houve correlação com o hospedeiro. Lima (2005), a partir do perfil dos fragmentos de restrição da região ITS do rDNA, verificou dois grupos distintos entre *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, não sendo possível correlacionar estes grupos com a origem geográfica e o hospedeiro. Esse tipo de associação

também não foi observado entre isolados de *M. anisopliae* (Velásquez et al., 2007). A análise dos fragmentos obtidos após clivagem de sequências de mtDNA mostrou-se excelente para a detecção de diferenças entre isolados de *M. anisopliae* quando comparada a análise de rDNA (Mavridou & Typas, 1998). A técnica ITS-RFLP também é utilizada em estudos de diferenciação intraespecífica de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* (Coates et al., 2002; Gaitan et al., 2002), *Beauveria brongniartii* (Wada et al., 2003) e *Entomophthora muscae* (Cohn) Fresenius (Jensen et al., 2001). A partir de estudos de polimorfismo, esta técnica é utilizada para o desenho de iniciadores específicos para detecção e identificação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Destéfano et al., 2004) e *M. anisopliae* var. *acridum* (Entz et al., 2005).

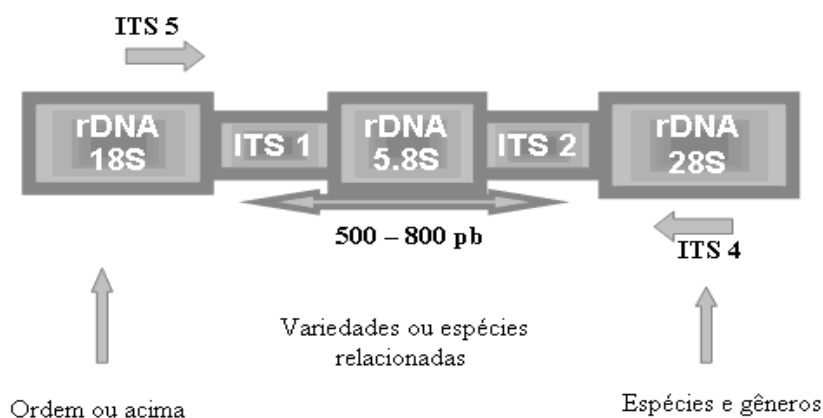


Figura 2 - Estrutura do agregado gênico que codifica RNA ribossômico. Fonte: Fungaro (2000).

Os cromossomos eucarióticos contêm genes interrompidos por regiões não codificadoras, os *introns*, e as regiões com informações codificadoras, que são representadas pelas proteínas, os *exons*. Os *introns* foram separados em quatro categorias de acordo com suas características estruturais e os mecanismos de remoção, sendo *intron* do grupo I, *intron* do grupo II, *intron* de pre-mRNA nuclear e *intron* do tRNA nuclear (Haugen et al., 2005). Os *introns* dos grupos I e II são classificados de acordo com suas organizações internas e têm uma capacidade intrínseca de autorremoção por montagem. Estes dois últimos podem ser utilizados como marcadores moleculares em estudos de diversidade intra e interespecíficos.

Os *introns* do grupo I são encontrados em organismos eucarióticos como os fungos, os protistas e as algas verdes, presentes no genoma nuclear, mitocondrial e do cloroplasto. No genoma nuclear eucariótico, *introns* do grupo I são encontrados nos genes do rDNA,

em sítios específicos que codificam as subunidades maior e menor do rRNA (Haugen et al., 2005). Estes *introns* são elementos genéticos autônomos caracterizados pela sua habilidade de transferência de um alelo para outro que não o contém, pois, alguns são elementos móveis (transposons) e pela sua capacidade de autorremoção do RNA transcrito (Nodari, 1999). Nesse último caso, o *intron* dobra-se por pareamento intramolecular de bases em uma estrutura complexa na qual os dois sítios de corte são aproximados. Este *intron* com pareamento de bases é uma ribosima que catalisa sua própria reação de remoção (Figura 3). O mecanismo de autorrecomposição envolve uma série de transferências de ligação fosfodiéster, sem perda e sem ganho de ligações no processo, e requer um nucleotídeo guanina com um grupo 3' –OH livre (exo G). A remoção inicia-se com a ligação deste nucleotídeo a um sítio específico no RNA (junção *exon 1 – intron*, sítio 5') que desencadeará a remoção do *exon 2* (sítio 3'). Na segunda etapa, ocorre a ligação dos *exons* e liberação do *intron* (Haugen et al., 2005).

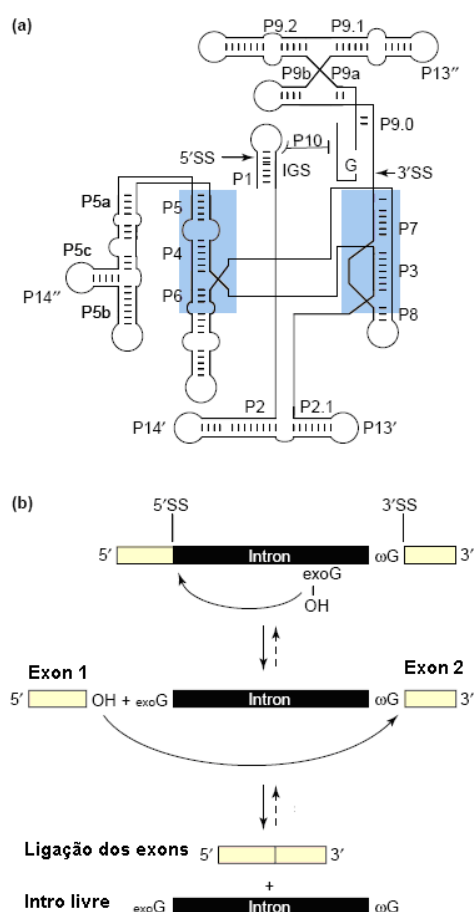


Figura 3 - (a) Estrutura secundária de um *intron* do grupo I; (b) processo de autorremoção do *intron*. Fonte: Haugen et al. (2005).

A distribuição dos *introns* do grupo I é geralmente irregular, presentes em alguns isolados e ausentes em outros, sendo uma fonte para detecção de variabilidade genética. Foram identificados em isolados de *M. anisopliae* cinco *introns* distintos, todos do grupo I, posicionados em diferentes sítios de inserção da região 28S do rRNA (Mavridou et al., 2000). Diversidade genética entre isolados de *M. anisopliae* foi observada em estudos de genes relacionados à subunidade maior do ribossomo, com quatro sítios de inserção de *introns* do grupo I, e devido à presença/ausência desses *introns* sete grupos foram formados (Márquez et al., 2006). A utilização do iniciador EI1, que amplifica região de *intron* do grupo I, detectou diferenças entre variedades de *M. anisopliae* (Lima, 2005; Carneiro-Leão, 2006). Esta técnica também é utilizada em estudos de polimorfismo de *B. bassiana* (Wang et al., 2003) e *B. brongniartii* (Neuvéglise et al., 1997).

DNA microssatélite é aquele que possui sequências curtas repetidas em *tandem*. Neste caso, a estratégia para a análise é a amplificação do fragmento que contém as repetições, utilizando oligonucleotídeos que hibridizam com as regiões que flanqueiam as repetições, técnica conhecida como SSR. Ao contrário do que ocorre na análise de microssatélite, a técnica ISSR consiste na amplificação de um fragmento que existe entre duas regiões repetitivas que estão presentes em vários genomas (Matioli & Passos-Bueno, 2001), por isso também conhecida como intermicrossatélite. Esse marcador foi eficiente em detectar diferenças entre variedades de *M. anisopliae* (Lima, 2005; Carneiro-Leão, 2006). Alto nível de polimorfismo também foi encontrado para isolados de *B. bassiana*, sendo estes agrupados de acordo com a origem geográfica (Aquino de Muro et al., 2005; Wang S. et al., 2005; Estrada et al., 2007) e para isolados de *E. muscae* (Lihme et al., 2009) e de *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber (Tymon & Pell, 2005). O marcador SSR também foi utilizado em estudos de polimorfismo de *M. anisopliae* e os iniciadores utilizados não foram eficientes na detecção de polimorfismo de isolados obtidos de amostras de solo de diferentes regiões do Chile (Velásquez et al., 2007) e de países da Ásia e Europa (Freed et al., 2010).

As técnicas de genética molecular podem auxiliar na resolução de problemas taxonômicos e na determinação da variação genética inter e intraespecífica. Os estudos de polimorfismo contribuem para a compreensão da diversidade genética e da estrutura das populações de fungos e estas informações são muito importantes em um programa de controle biológico.

2.4 Seleção de fungos entomopatogênicos

No Brasil, o controle microbiano das cigarrinhas é um dos programas mais antigos e eficientes no qual foram realizados estudos de coleta e seleção de isolados com diferentes graus de virulência e especificidade para cada praga alvo, visando sua adaptação às condições ambientais diversas. O caso mais conhecido é o emprego de *M. anisopliae* na Região Nordeste para o controle da cigarrinha-da-folha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* Stal (Hemiptera: Cercopidae). Estes estudos foram iniciados em 1969 e, a partir de 1975, as usinas de Pernambuco realizaram a instalação de laboratórios para a produção do entomopatógeno (Marques et al., 1981; Alves, 1998b). Este programa contribuiu para a abertura de várias empresas voltadas para a produção de entomopatógenos e, atualmente, do total de fungos utilizados no Brasil, 66% é produzido no Nordeste, 26% no estado de São Paulo, 7% no estado de Mato Grosso e 1% em outros estados (Alves et al., 2008b).

Vários trabalhos são conduzidos na busca do isolamento e da seleção de fungos entomopatogênicos, que poderão ser eficientes controladores de vários insetos considerados pragas (Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Isoptera e Orthoptera) (Shimizu & Yamaji, 2003; Alexandre et al., 2006; Entz et al., 2008; Anand et al., 2009).

Isolados dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Sporothrix insectorum* Hoog & Evans foram testados contra adultos do percevejo-de-renda da mandioca, *Vatiga illudens* Drake (Hemiptera: Tingidae), sendo que *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram mais eficientes (Oliveira et al., 2001). Isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* também foram testados contra ovos, ninfas e adultos do percevejo *Blissus antillus* Leonard (Hemiptera: Lygaeidae), sendo verificada maior eficiência de um isolado de *B. bassiana* no controle de ninfas e adultos, apresentando mortalidade confirmada de 53 e 78% (Samuels & Coracini, 2004) e de um isolado de *M. anisopliae* no controle dos ovos, causando infecção de 96,7% (Samuels et al., 2002). Atividade patogênica exercida por alguns fungos entomopatogênicos sobre os pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) foi observada por meio do Tempo Letal (TL) e *M. anisopliae* foi o mais virulento. Foi verificado que *M. persicae* apresentou maior suscetibilidade para *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Loureiro & Moino Jr., 2006). Além destas duas espécies, alguns isolados de *Fusarium* sp, *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) Brown & Smith [= *Isaria farinosa* (Holmsk.)] e *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & Gams também foram patogênicos a *M. persicae* (Reid et al., 2010). *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram eficientes

no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* Kaltenbach (Hemiptera: Aphididae) (Araujo Jr. et al., 2009). A patogenicidade de *M. anisopliae* também foi testada em ninfas e adultos do percevejo-castanho-da-raiz *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae), separadamente, em laboratório e em casa de vegetação. Nessa última, os níveis de mortalidade foram maiores para as ninfas do que para os adultos (Xavier & Ávila, 2006). Outro percevejo subterrâneo, *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) foi suscetível a isolados de *M. anisopliae* e *Paecilomyces* sp. (Jaramillo & Borgemeister, 2006). *M. anisopliae* foi patogênico ao inseto *Oncometopia facialis* Signoret (Hemiptera: Cicadellidae), vetor da clorose variegada dos citros, causando uma mortalidade de 87,1% (Pria Júnior et al., 2008). Para o percevejo *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae), *M. anisopliae* foi mais virulento que *B. bassiana* (Ihara et al., 2001).

Os trabalhos acima relatam a patogenicidade de fungos contra insetos-praga, porém, também já foi relatado o efeito de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre insetos benéficos como o percevejo predador *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae). *M. anisopliae* ocasionou maior mortalidade do predador tanto por contato quanto por resíduo seco do fungo (suspensão de conídios em folhas de algodoeiro), sugerindo um critério cuidadoso no uso integrado com este percevejo quando se deseja preservar o controle exercido por ambos (França et al., 2006).

Quanto ao controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *M. fimbriolata* foi testada a patogenicidade de isolados de *M. anisopliae*, provenientes de diferentes hospedeiros e regiões do Brasil (Loureiro et al., 2005), e também de isolados obtidos das cigarrinhas *M. posticata* e *M. fimbriolata* (Macedo et al., 2006). Esses últimos autores realizaram uma mudança no método do bioensaio, utilizando as raízes de mudas de cana-de-açúcar como substrato para as ninfas, causando uma diminuição da mortalidade na testemunha que foi inferior a 20% no quinto dia após a inoculação do fungo. Loureiro et al. (2005) utilizaram folhas de cana-de-açúcar como alimento para as ninfas, obtendo mortalidade de até 90% na testemunha no sexto dia. Alguns trabalhos foram realizados com aplicações de *M. anisopliae* em condições de campo contra *M. fimbriolata*, sendo observada uma redução ao nível populacional deste inseto (Batista Filho et al., 2003; Dinardo-Miranda et al., 2004; Loureiro, 2004). Enquanto Almeida et al. (2003) não verificaram diferenças entre área tratada com *M. anisopliae* e a testemunha, devido ao baixo nível populacional de cigarrinhas na área experimental.

Os trabalhos relatados demonstram que a suscetibilidade dos insetos aos fungos

entomopatogênicos é bastante variável, inclusive quando são analisadas as diferentes fases de desenvolvimento e que *M. anisopliae* é muito eficiente no controle de várias espécies de insetos da ordem Hemiptera. Esses estudos permitem que seja realizada a seleção dos fungos mais eficientes no controle de uma determinada praga constituindo a primeira etapa a ser adotada em programas de controle biológico. As etapas subsequentes estão relacionadas aos estudos de desenvolvimento de sistemas de produção, formulação de inóculos e testes no campo. Portanto, a escolha deve recair sobre o isolado que seja altamente patogênico para a praga-alvo e que apresente qualidade adequada para a produção massal.

2.5 Ecologia de *Metarhizium anisopliae* no solo

A espécie apresenta uma versatilidade metabólica e ecológica, visto que foi observada sua capacidade de colonizar a rizosfera e aderir à superfície de raízes de plantas, podendo exercer uma considerável influência neste nicho ecológico como repelindo e matando insetos do solo (Hu & St. Leger, 2002). Bruck (2005) observou que conídios de *M. anisopliae* apresentaram uma maior persistência na rizosfera de *Picea abies* Linnaeus comparado ao solo. Por outro lado, St. Leger (2008) realizou um estudo piloto em parcelas de pastagem e mostrou que *M. anisopliae* pode sobreviver anos no solo, mas com flutuações ao nível populacional. Porém, são necessários estudos que comprovem que a rizosfera das plantas geralmente é um “refúgio” (local onde o fungo pode sobreviver fora do inseto hospedeiro) para *M. anisopliae* no solo. Meyling & Eilenberg (2007) sugerem que a associação com as plantas seja importante no ciclo biológico de *M. anisopliae* em regiões temperadas. Possivelmente, este fungo tem múltiplas funções na proteção da planta, como efeito antagônico contra fungos fitopatogênicos como *Fusarium oxysporum* Smith & Swingle, *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries e *Alternaria solani* Sorauer (Chul et al., 1996).

Alguns estudos buscam compreender os mecanismos moleculares envolvidos na capacidade de *M. anisopliae* aderir ao inseto ou as raízes, neste sentido, duas adesinas foram identificadas, MAD1 e MAD2. A adesina MAD1 está envolvida na patogenicidade contra insetos e MAD2 na adesão em raízes de plantas (Wang & St. Leger, 2007a). Outro estudo relativo à expressão gênica demonstrou que *M. anisopliae* desenvolveu diferentes adaptações para atuar como patógeno (crescimento na cutícula e na hemofinfa do

hospedeiro) e como sapróbio na rizosfera (crescimento em exsudato de raiz de feijão) (Wang C. et al., 2005). Assim, o paradigma estabelecido que *M. anisopliae* é principalmente patógeno de insetos é discutível, sendo necessários realizar estudos para melhor compreensão do seu papel ecológico no solo (St. Leger, 2008).

Alguns estudos investigaram a persistência de *M. anisopliae* no solo sob condições controladas (Lanza et al., 2004; Guerra et al., 2009). A maior sobrevivência do fungo ocorreu em solo de textura areno-argilosa e em solos com grau de compactação caracterizado por valores médios de densidade (Lanza et al., 2004). Em outro trabalho foi verificado que *M. anisopliae* apresentou maior número médio de colônias recuperadas aos 30 dias e persistiu viável no solo esterilizado durante os 120 dias do experimento (Guerra et al., 2009). Por outro lado, foi observado que *M. anisopliae* permaneceu viável no solo durante 216 dias após sua aplicação no campo (Martins et al., 2004).

A introdução de micro-organismos exógenos em ecossistemas naturais e em agroecossistemas pode afetar a comunidade microbiana do solo e, conseqüentemente, os diversos processos ecológicos deste ambiente. A técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) é bastante utilizada nos estudos de ecologia microbiana. Esta técnica é usada para separar fragmentos de DNA de mesmo tamanho mas com sequência de bases nucleotídicas diferentes. Inicialmente é feita a amplificação do DNA através de PCR e um dos iniciadores apresenta uma região rica em G+C (grampo G-C) que visa impedir a total desnaturação da dupla fita de DNA durante a eletroforese. Os fragmentos obtidos por PCR são separados, de acordo com a sua composição nucleotídica, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo gradiente desnaturante (uréia e formamida) que rompe as pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos (Figura 4). A sequência de nucleotídeos determina o momento em que o DNA, inicialmente em fita dupla, passará a adquirir uma estrutura de fita simples, e as duas fitas simples são mantidas ligadas pelo grampo (Xavier et al., 2004).

Produtos a base de micro-organismos que controlam patógenos e pragas e que favorecem o desenvolvimento de plantas cultiváveis (inoculantes) são tecnologias utilizadas em vários países incluindo o Brasil, com respostas positivas quanto ao fins para os quais são empregados. No entanto, existe pouca informação sobre o efeito da aplicação dessas espécies na comunidade microbiana do solo e da rizosfera. A análise do perfil dos fragmentos de DGGE revelou que plantas do milho (*Zea mays* Linnaeus) inoculadas com *Azospirillum brasiliense* Tarrand, Krieg & Döbereiner não apresentaram alteração no perfil

da comunidade bacteriana, e que a idade da planta apresentou maior influência na estrutura da comunidade de rizobactérias (Herschkovitz et al., 2005a; b). Sementes de soja [*Glycine max* (Linnaeus) Merrial] inoculadas com *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) Priest Goodfellow Shute & Berkeley BNM122, um potencial agente de biocontrole de *Rhizoctonia solani* Kühn, também não apresentaram mudanças na comunidade bacteriana de amostras de solo rizosférico (Correa et al., 2009). Entretanto, a pulverização de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) em pimenta (*Capsicum annuum* Linnaeus) pode ter causado a mudança da estrutura da comunidade bacteriana na filosfera dessa planta (Zhang et al., 2008).

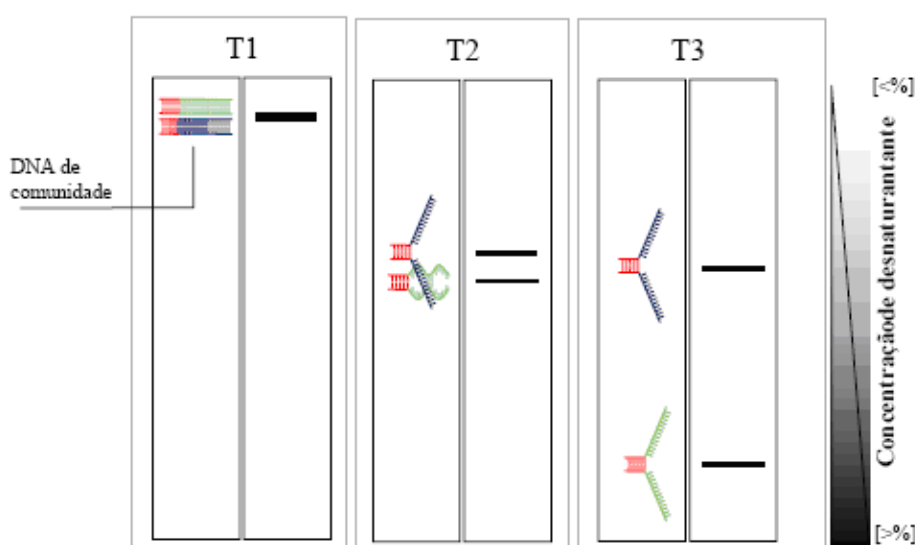


Figura 4 – Esquema de mobilidade eletroforética do DNA em um gel com gradiente desnaturante, tipo DGGE, ao longo de intervalos de tempo (T1, T2 e T3). Fonte: Xavier et al. (2004).

O efeito da introdução de fungos entomopatogênicos na comunidade microbiana do solo é um aspecto ecológico ainda pouco estudado. Um recente estudo utilizou a técnica de análise do espaço ribossomal interno (RISA – *Ribosomal Internal Spacer Analysis*) a fim de verificar o efeito de *B. brongniartii* na estrutura da comunidade fúngica do solo em microcosmos. Foi observado que a presença do fungo no solo sem o inseto causou pouco e transitório efeito na comunidade fúngica deste solo, diferindo do observado para o inseticida Carbofuran, cujo efeito aumentou significativamente no final do experimento (Schwarzenbach et al., 2009). Com exceção deste último trabalho, os demais foram realizados visando verificar o efeito do inóculo de fungos micorrízicos e solubilizadores de fosfato na estrutura da comunidade microbiana da rizosfera de plantas de importância

econômica (Marschner et al., 2001; Wamberg et al., 2003; Roesti et al., 2006; Wang et al., 2007). A presença do fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* Schenck & Smith pode ter alterado a comunidade bacteriana na rizosfera de ervilha (*Pisum sativum* Linnaeus) limitando o crescimento de algumas bactérias após inoculação do fungo (Wamberg et al., 2003). Resultados semelhantes foram observados em plantas do milho (*Z. mays*) inoculadas com *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerd.) Gerdemann & Trappe e *G. intraradices* (Marschner et al., 2001) e em *Acacia auriculiformis* A. Cunn ex Benth. inoculadas com a ectomicorriza *Pisolithus albus* (Cooke & Masee) Priest (Assigbetse et al., 2005). Em contrapartida foi observado um aumento da comunidade bacteriana após a inoculação de fungos solubilizadores de fosfato como *Aspergillus niger* Van Thieghem e *Penicillium oxalicum* Currie & Thom em plantas de milho e soja, sendo verificada uma maior diversidade na rizosfera da soja (Wang et al., 2007).

Os trabalhos demonstraram que a estrutura da comunidade microbiana do solo e da rizosfera pode, em alguns casos, ser influenciada pela introdução dos micro-organismos exógenos, reduzindo ou aumentando a diversidade de micro-organismos. A persistência dos fungos entomopatogênicos no solo e possíveis efeitos de sua aplicação na diversidade estrutural e funcional das comunidades microbianas do solo e da rizosfera são alguns dos aspectos ecológicos cujo conhecimento é essencial, visto que os micro-organismos são uma importante fração da biota do solo tanto pela diversidade de espécies quanto pela multiplicidade de atividades metabólicas desempenhadas.

3. POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* BASEADO NOS MARCADORES MOLECULARES ITS-RFLP, ISSR E ISSP¹

Resumo. Com o objetivo de se caracterizar isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, utilizando as técnicas moleculares ITS-RFLP, ISSR e ISSP, foram analisados 37 isolados, a maioria obtida de *Mahanarva fimbriolata* Stal de uma mesma região geográfica. A técnica ITS-RFLP não diferenciou os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, enquanto os iniciadores de ISSR e ISSP evidenciaram três grupos distintos. A variabilidade entre estes grupos foi de 96,27% para (GTG)₅ e 100% para os outros iniciadores. Os iniciadores de ISSR e de ISSP diferenciaram isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, confirmando que existe variabilidade genética entre isolados de mesma origem geográfica e mesmo hospedeiro.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, *Mahanarva fimbriolata*, ITS-RFLP, ISSR, ISSP.

Introdução

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin é utilizado para controlar diversas pragas, destacando seu emprego contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* Stal (Hemiptera: Cercopidae), que causa sérios danos a esta cultura nas regiões Sudeste, Centro-oeste e Nordeste do Brasil (Dinardo-Miranda et al., 2006). Segundo Peixoto et al. (2009), para cada ninfa por metro linear ocorre perda relativa de 2,3% toneladas de cana por hectare.

A variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos pode ser considerada uma das principais vantagens no controle microbiano de insetos (Alves, 1998a) e pode ser detectada por meio de marcadores moleculares. Estes poderão detectar diferenças no DNA que irão auxiliar na compreensão da diversidade genética e da estrutura das populações de fungos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Marcadores moleculares baseados na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) como espaçador interno transcrito-polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (ITS-RFLP – *Internal Transcribed Spacer-Restriction Fragment Length Polymorphism*), sequências

¹ Trabalho aceito para publicação: Tiago, P.V., Carneiro-Leão, M.P., Luna-Alves Lima, M., Oliveira, N.T., Luna-Alves Lima, E.A. 2010. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* based on molecular markers ITS-RFLP, ISSR and Intron. *Genetics and Molecular Research*, no prelo.

internas simples repetidas (ISSR – *Inter Simple Sequence Repeats*) e ISSP – *Intron Splice Site Primer* são usados para a caracterização inter e intraespecífica de *Metarhizium* e *Beauveria* (Márquez et al., 2006; Estrada et al., 2007; Velásquez et al., 2007).

ITS-RFLP permite diferenciar espécies e isolados de *Metarhizium* com base na presença ou ausência de sítios de restrição no rDNA (Pipe et al., 1995). Esta técnica, devido ao polimorfismo observado, foi utilizada para o desenho de iniciadores específicos para *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Destéfano et al., 2004) e *M. anisopliae* var. *acridum* Driver & Milner (Entz et al., 2005). A técnica ISSR foi utilizada para estudar a variabilidade genética de duas variedades de *M. anisopliae* de diferentes localidades (Lima, 2005) e de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin na China (Wang S. et al., 2005), na Ásia (Aquino de Muro et al., 2005) e no Japão (Takatsuka, 2007). Os *introns* do grupo I, encontrados nos genes do rDNA de eucariotos, possuem distribuição geralmente irregular, presentes em alguns isolados e em outros ausentes, podem ser uma fonte para detecção de variabilidade genética (Mavridou et al., 2000). Marcadores como DNA amplificado ao acaso (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*), sequências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*) e polimorfismo do tamanho de fragmentos amplificados (AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*) também foram utilizados para estudos de variabilidade genética de isolados de *M. anisopliae* de diferentes hospedeiros e origem geográfica (Velásquez et al., 2007; Inglis et al., 2008; Freed et al., 2010).

O objetivo do trabalho foi caracterizar isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* utilizando ITS-RFLP, ISSR e ISSP, para fins de análise do polimorfismo entre isolados de uma mesma espécie e avaliar os marcadores moleculares que forneçam DNA *fingerprints* destes isolados que possam auxiliar na sua detecção em trabalhos de laboratório e de campo.

Material e Métodos

Isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e extração do DNA

Foram estudados 37 isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* a maioria obtida da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *M. fimbriolata*, com exceção dos isolados URM6106 e URM6112 que foram obtidos de amostras de solo, no município de Tangará da Serra, Sudoeste de Mato Grosso, Brasil. O isolado URM6098 foi obtido de *M. fimbriolata*, no

município de Aripuanã, Norte de Mato Grosso. Estes isolados foram depositados na Micoteca - URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Foi utilizado como grupo externo o isolado de *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412.

Os fungos foram cultivados em Meio Mínimo Líquido (Pontecorvo et al., 1953) e mantidos sob agitação de 35 rpm a 28°C por 120 horas. Em seguida, o micélio foi coletado por filtração a vácuo e lavado com água destilada esterilizada. Foi determinado o peso úmido para a extração do DNA e estocado a -20°C. O DNA foi extraído pelo método de Kuramae-Isioka (1997).

Amplificação da Região ITS do rDNA

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo tampão de reação (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), iniciadores ITS4 e ITS5 0,2 µM cada (Bioneer, Daedeok-gu, Daejeon, South Korea), Taq DNA polimerase 0,04 U/µL (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 25 ng de DNA, as reações foram realizadas por uma modificação do método de Lima (2005). A amplificação ocorreu com a seguinte programação: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos (1 ciclo), 92°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos (40 ciclos) e extensão final a 72°C por 5 minutos (1 ciclo). Os produtos da amplificação do *locus* ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), a 3 V/cm em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0) e utilizando um marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). O gel contendo brometo de etídio foi visualizado em transluminador ultravioleta e fotografado em máquina digital.

ITS-RFLP – *locus* ITS1 - 5.8S - ITS2 do rDNA

A digestão enzimática foi realizada pela mistura de 4 µL do produto de PCR das regiões ITS do rDNA com 16 µL do mix de restrição contendo 0,1 U das enzimas de restrição: *Dra* I, *Pst* I, *Msp* I, *Alu* I, *EcoR* I, *Hae* III, *Hinf* I e *Bsh* 1236I (Fermentas, Vilnius, Lithuania) em tampão de restrição específico. Cada reação foi incubada a 37°C por três horas. Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose

(2%), seguindo os procedimentos descritos acima.

ISSR

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo tampão de reação (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,25 mM (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), iniciadores (GACA)₄ e (GTG)₅ 0,25 µM (Bioneer, Daedeok-gu, Daejeon, South Korea), Taq DNA polimerase 0,04 U/µL (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 25 ng de DNA, as reações foram realizadas por uma modificação do método de Lima (2005). A amplificação ocorreu com a seguinte programação: desnaturação inicial a 93°C por 5 minutos (1 ciclo), 93°C por 20 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos (40 ciclos) e extensão final a 72°C por 6 minutos (1 ciclo). Para o iniciador M13, as reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo tampão de reação (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), MgCl₂ 2,0 mM, dNTP 0,25 mM (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), iniciador M13 0,5 µM (Bioneer, Daedeok-gu, Daejeon, South Korea), Taq DNA polimerase 0,04 U/µL (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 25 ng de DNA, as reações foram realizadas por uma modificação do método de Lima (2005). Foi utilizada a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos (35 ciclos) e extensão final a 72°C por 5 minutos (1 ciclo). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), a 3 V/cm em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0), e utilizando um marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). O gel contendo brometo de etídio foi visualizado em transluminador de ultravioleta e fotografado utilizando máquina digital.

ISSP

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo tampão de reação (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,25 mM (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), iniciador EI1 0,5 µM (Bioneer, Daedeok-gu, Daejeon, South Korea), Taq DNA polimerase 0,04 U/µL (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 25 ng de DNA, as reações foram realizadas por uma

modificação do método de Lima (2005). A amplificação ocorreu com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 minuto, 44,5°C por 1 minuto, 74°C por 30 segundos (40 ciclos) e extensão final a 74°C por 5 minutos (1 ciclo). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) conforme descrito para o marcador ISSR.

Análise dos dados moleculares

Os dados obtidos com marcadores moleculares foram analisados pelo programa NTSYSpc 2.1 (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) segundo Rohlf (2000) e foram introduzidos na forma de variáveis binárias para construção de uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard. A partir da construção da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average*), onde também foi calculada a matriz cofenética. Para a análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizado o programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005).

Resultados

O produto de amplificação do *locus* ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5, apresentou fragmento em torno de 600 pb para os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e de aproximadamente 700 pb para *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412.

O fragmento amplificado de ITS não apresentou sítio de restrição para as enzimas *DraI*, *PstI* e *AluI* para todos os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Figura 1a; c). As enzimas *MspI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HinfI* e *Bsh1236I* geraram fragmentos monomórficos, não diferenciando os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Figura 1b; d; e; f; g). Estas enzimas geraram fragmentos de tamanhos diferentes: *MspI* (370, 130 e 100 pb), *EcoRI* (290, 310 pb), *HaeIII* (450, 150 pb), *HinfI* (280, 100 pb) e *Bsh1236I* (380, 120, 100 pb). Fragmentos menores que 100 pb não foram visualizados no gel e não foram considerados. O fragmento de ITS do isolado de *M. anisopliae* var. *acridum* URM 4412 não apresentou sítio de restrição para as enzimas *DraI* e *PstI*, mas apresentou um perfil de restrição que diferiu dos isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* quando se utilizou as enzimas *AluI*

(450, 250 pb), *EcoRI* (300 pb), *HaeIII* (500, 150 pb), *HinfI* (280, 200, 100 pb) e *Bsh1236I* (470, 130, 100 pb). O marcador ITS-RFLP apresentou o mesmo padrão de fragmentos para todos os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e não é recomendado em estudos que visem à diferenciação destes isolados de amostras obtidas em laboratório e campo.

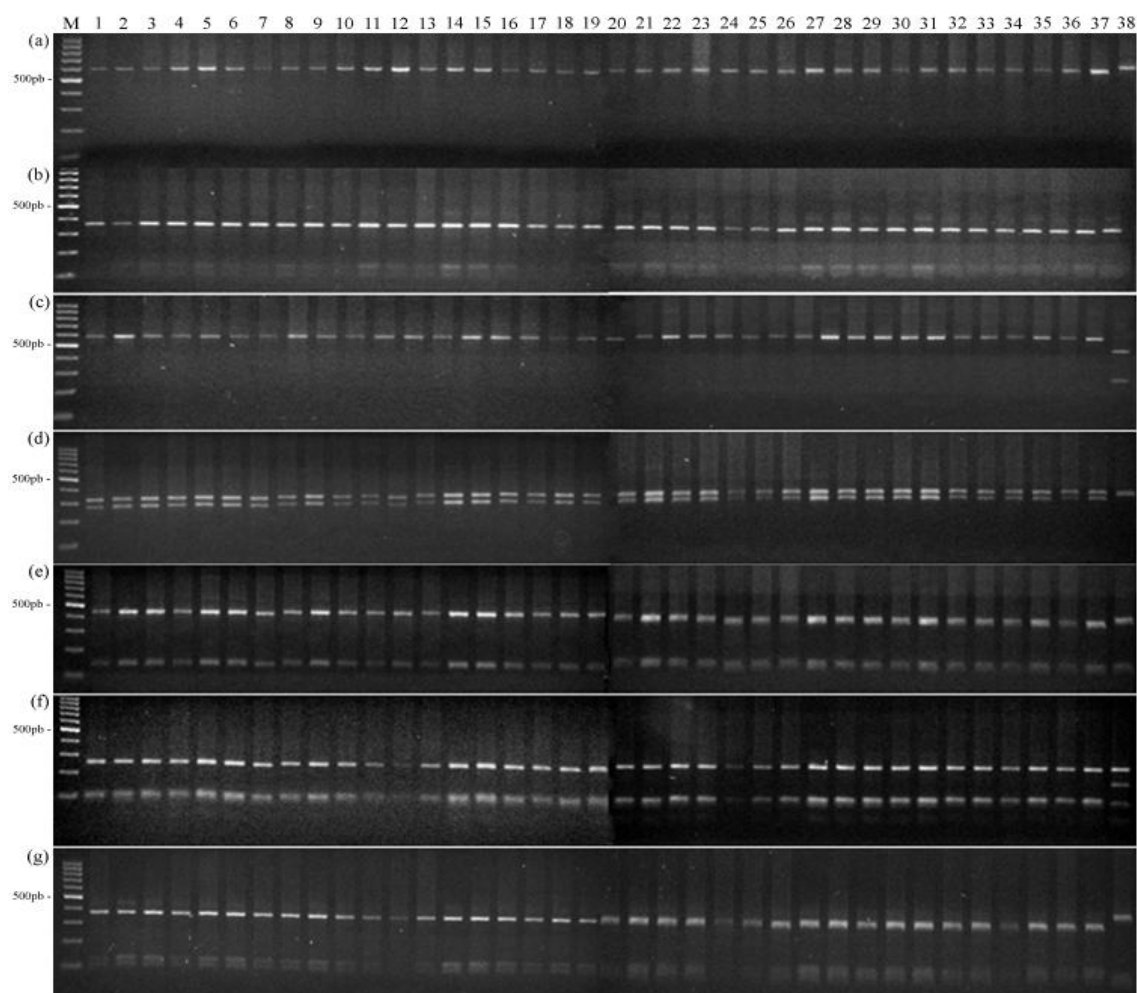


Figura 1 - Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA obtidos com as enzimas *DraI*, *PstI* (a); *MspI* (b); *AluI* (c); *EcoRI* (d); *HaeIII* (e); *HinfI* (f); *Bsh1236I* (g). Na pista M, marcador de peso molecular 100 pb; Nas pistas de 1 a 37 representam isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. Na pista 38, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM 4412.

Os dendrogramas gerados evidenciaram semelhanças de tamanho de fragmentos, ao nível de 100%, formando três grupos distintos para os iniciadores de ISSR [(GACA)₄, (GTG)₅ e M13] e ISSP (EI1) (Figuras 2; 3; 4; 5). Com o iniciador (GACA)₄ verificou-se o não agrupamento dos isolados URM6098, URM6104, URM6106, URM6107, URM6109, URM6112, URM6131, URM6133 e URM6210 (Figura 2). Para o (GTG)₅ foi verificado o

não agrupamento dos isolados URM6035, URM6104, URM6106, URM6108 e URM6112 (Figura 3) e para o EI1 apenas o isolado URM6133 (Figura 5). Entre os isolados que não se agruparam, destacaram-se URM6104, URM6106 e URM6112 por apresentarem perfis de fragmentos diferentes, utilizando dois dos quatro iniciadores testados, sendo que os dois últimos foram obtidos de amostras de solo. Os marcadores ISSR e ISSP evidenciaram diferenças entre os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, sendo estas maiores para o iniciador (GACA)₄ e menores para o iniciador M13 (Figura 4). Este último evidenciou menor polimorfismo, uma vez que 84% dos isolados estudados se agruparam no grupo 1. Não foram observados grupos coincidentes entre os dendrogramas, porém os isolados URM5948, URM5949, URM5951, URM5952, URM6034, URM6100, URM6102, URM6103, URM6105, URM6113, URM6114 e URM6128 mantiveram-se agrupados em todos os dendrogramas.

A análise de variância molecular indicou que a variabilidade foi maior entre os grupos do que dentro dos mesmos (Tabela 1). Nos grupos gerados pelo dendrograma foi observado que a variabilidade entre estes grupos, aparentemente iguais, foi de 96,27% para (GTG)₅ e 100% para os outros iniciadores. Desconsiderando os agrupamentos formados e comparando os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e o grupo externo *M. anisopliae* var. *acridum* foi observado que a variabilidade entre estes dois grupos, variou de 77,11% a 89,80% e a variabilidade dentro deles foi de 10,19% a 22,89%. Foram observados 15 produtos exclusivos de amplificação das duas variedades, sendo sete presentes somente em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e oito exclusivos de *M. anisopliae* var. *acridum*.

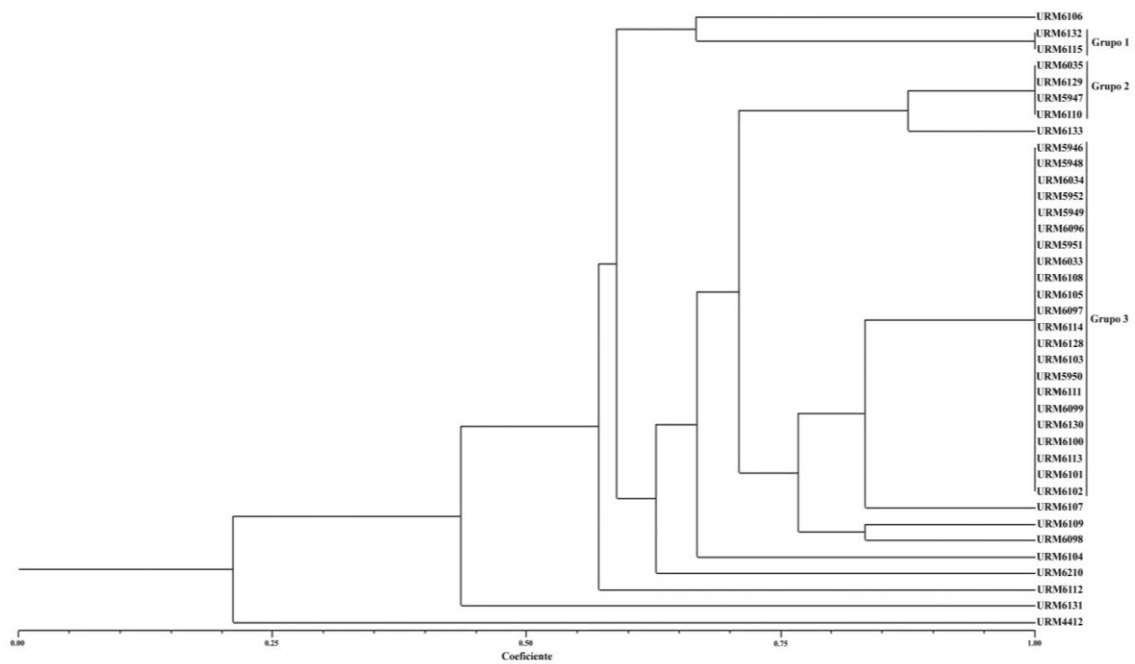


Figura 2 - Dendrograma de similaridade genética de 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a partir dos produtos de amplificação do iniciador (GACA)₄. URM4412: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. $r = 96,10\%$. Grupo 1: URM6132, URM6115; Grupo 2: URM6035, URM6129, URM5947, URM6110; Grupo 3: URM5946, URM5948, URM6034, URM5952, URM5949, URM6096, URM5951, URM6033, URM6108, URM6105, URM6097, URM6114, URM6128, URM6103, URM5950, URM6111, URM6099, URM6130, URM6100, URM6113, URM6101, URM6102.

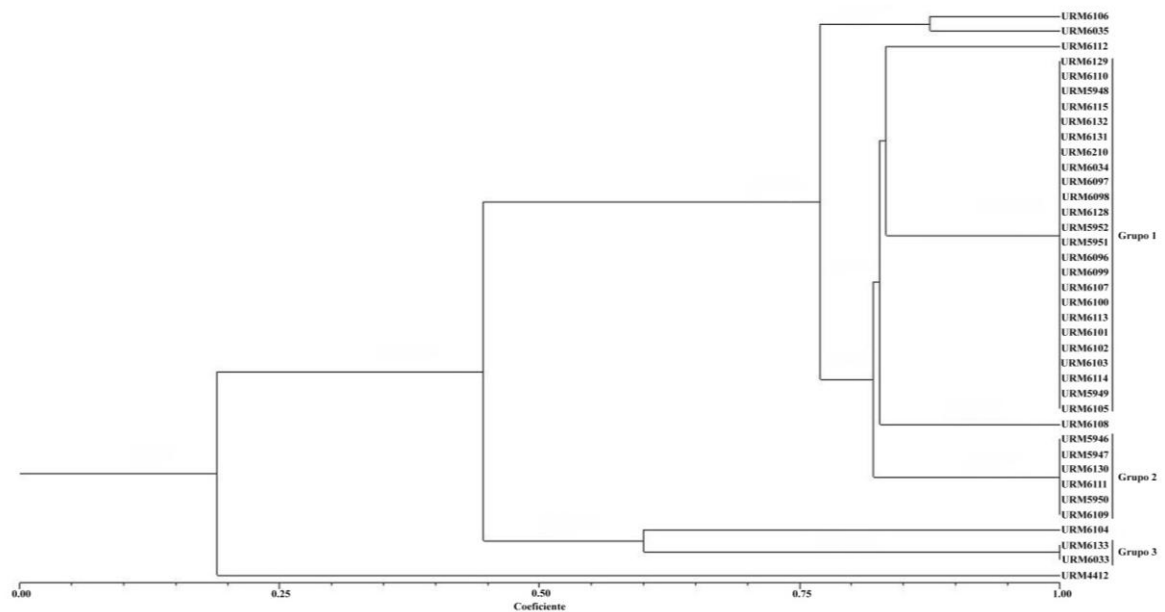


Figura 3 - Dendrograma de similaridade genética de 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a partir dos produtos de amplificação do iniciador (GTG)₅. URM4412: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. $r = 96,39\%$. Grupo 1: URM6129, URM6110, URM5948, URM6115, URM6132, URM6131, URM6210, URM6034, URM6097, URM6098, URM6128, URM5952, URM5951, URM6096, URM6099, URM6107, URM6100, URM6113, URM6101, URM6102, URM6103, URM6114, URM5949, URM6105; Grupo 2: URM5946, URM5947, URM6130, URM6111, URM5950, URM6109; Grupo 3: URM6133, URM6033.

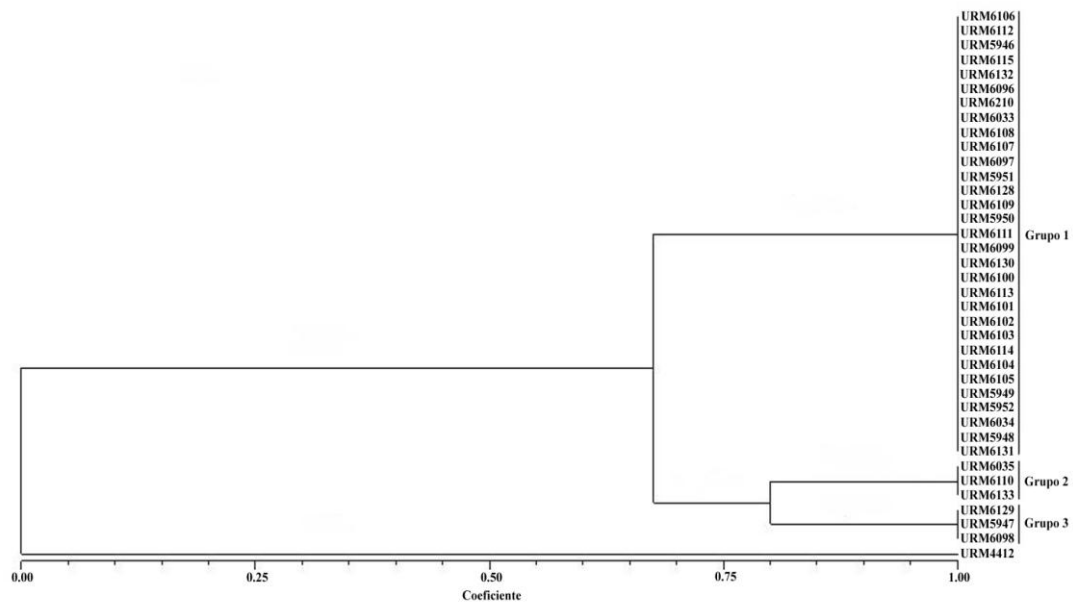


Figura 4 - Dendrograma de similaridade genética de 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a partir dos produtos de amplificação do iniciador M13. URM4412: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. $r = 98,80\%$. Grupo 1: URM6106, URM6112, URM5946, URM6115, URM6132, URM6096, URM6210, URM6033, URM6108, URM6107, URM6097, URM5951, URM6128, URM6109, URM5950, URM6111, URM6099, URM6130, URM6100, URM6113, URM6101, URM6102, URM6103, URM6114, URM6104, URM6105, URM5949, URM5952, URM6034, URM5948, URM6131; Grupo 2: URM6035, URM6110, URM6133; Grupo 3: URM6129, URM5947, URM6098.

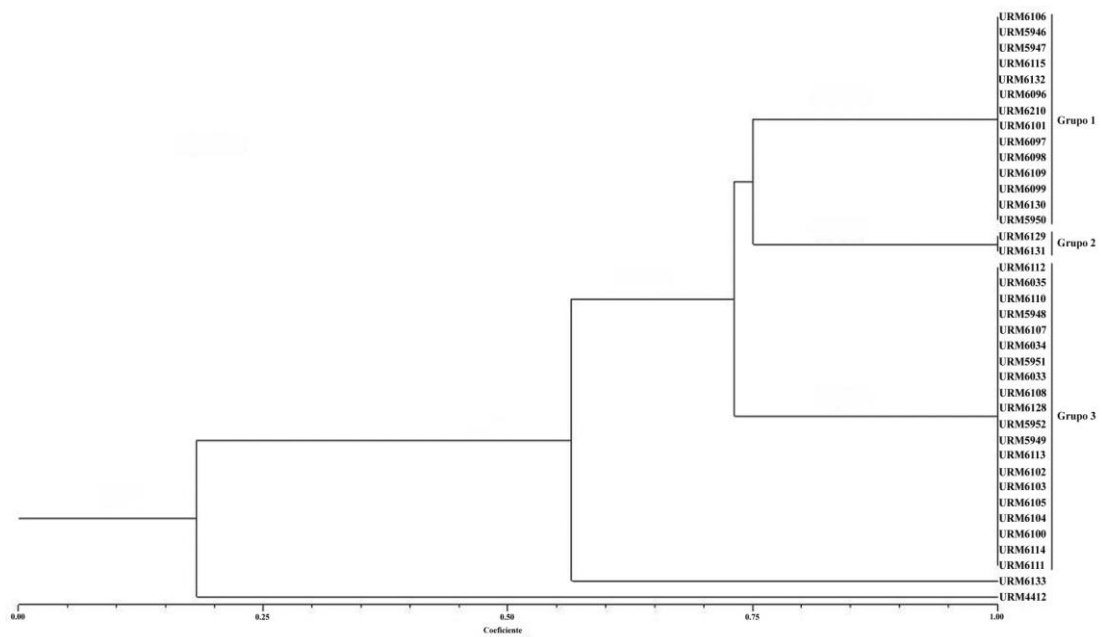


Figura 5 - Dendrograma de similaridade genética de 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a partir dos produtos de amplificação do iniciador EI1. URM4412: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. $r = 98,25\%$. Grupo 1: URM6106, URM5946, URM5947, URM6115, URM6132, URM6096, URM6210, URM6101, URM6097, URM6098, URM6109, URM6099, URM6130, URM5950; Grupo 2: URM6129, URM6131; Grupo 3: URM6112, URM6035, URM6110, URM5948, URM6107, URM6034, URM5951, URM6033, URM6108, URM6128, URM5952, URM5949, URM6113, URM6102, URM6103, URM6105, URM6104, URM6100, URM6114, URM6111.

Tabela 1 – Análise de variância molecular (AMOVA) dos marcadores ISSR e ISSP para 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e 1 isolado de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. A porcentagem de variação entre os grupos (FST) e dentro dos grupos (FSC) é apresentada, considerando tanto os marcadores em conjunto, quanto em separados

Iniciadores		Bootstrap FST		FST	FSC	Valor - P ^d
		95%	99%			
Iniciadores	NG					
Todos	2	0.8980	0.9165	0.8395	0.1604	0.0342
Todos	31	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
GACA4 ^a	2	0.8832	0.9149	0.7711	0.2288	0.0234
GACA4 ^b	3			1.0000	0.0000	0.0000
GACA4 ^c	13	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
GTG5 ^a	2	0.9352	0.9586	0.8622	0.1377	0.0254
GTG5 ^b	3	1.0000	1.0000	0.9627	0.0372	0.0000
GTG5 ^c	9	1.0000	1.0000	0.9719	0.0280	0.0000
ISSP ^a	2	0.9818	1.0000	0.8533	0.1466	0.0205
ISSP ^b	3			1.0000	0.0000	0.0000
ISSP ^c	5	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
M13 ^a	2	1.0000	1.0000	0.8980	0.1019	0.0185
M13 ^b	3			1.0000	0.0000	0.0000
M13 ^c	4	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000

a. considerando 2 grupos: isolados (*M. anisopliae* var. *anisopliae*) e *outgroup* (*M. anisopliae* var. *acridum*);

b. considerando somente os grupos com mais de 2 isolados formados pelo dendrograma: G1, G2 e G3;

c. considerando todos os grupos formados pelo dendrograma: G1, G2, G3, G4, ... Gn, *outgroup*.

d. * P < 0,05; **P < 0,01.

Discussão

Entre os 37 isolados foi verificada uma variabilidade genética dependente do marcador empregado. ITS-RFLP não diferenciou os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* quando o locus ITS1 - 5.8S - ITS2 do rDNA foi digerido com as enzimas *DraI*, *PstI*, *MspI*, *AluI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HinfI* e *Bsh1236I*. Velásquez et al. (2007) estudaram 39 isolados de *M. anisopliae* de diferentes regiões do Chile e observaram 12 genótipos após a digestão da região ITS1 com as enzimas *HhaI*, *HinfIII*, *MspI*, *Tru9I*, *AluI*, *HaeIII* e *RsaI* e nove genótipos após digestão da região ITS2 com as mesmas enzimas, exceto *RsaI*. O marcador ITS-RFLP diferenciou alguns isolados, porém não houve associação entre a diversidade observada e origem geográfica destes isolados. Contudo, Pipe et al. (1995) verificaram, a partir da digestão do rDNA com *BamHI*, *HindIII*, *PstI* e *XhoI*, que os isolados de *M. anisopliae* foram agrupados de acordo com a origem geográfica, mas não

houve correlação com o hospedeiro. ITS-RFLP também foi utilizada em estudos de diferenciação intraespecífica de *B. bassiana* (Coates et al., 2002; Gaitan et al., 2002; Aquino de Muro et al., 2005), *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch (Wada et al., 2003) e *Entomophthora muscae* (Cohn) Fresenius (Jensen et al., 2001). Isolados de *B. bassiana*, obtidos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, apresentaram o mesmo padrão de fragmentos após digestão do locus ITS1 - 5.8S - ITS2 do rDNA com *HaeIII*, *HpaII*, *EcoRI*, *PstI*, *AluI* e *MboI* (Aquino de Muro et al., 2003). Em outros casos, isolados de *B. brongniartii* (Neuvéglise et al. 1994) e de *E. muscae* (Jensen et al., 2001) obtidos de um mesmo hospedeiro apresentaram o mesmo padrão de fragmentos.

Os iniciadores (GACA)₄ e (GTG)₅ detectaram maior polimorfismo entre os 37 isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, devido ao não agrupamento de alguns isolados que apresentaram padrão de fragmentos diferentes. Os três grupos formados pelos marcadores ISSR e ISSP foram considerados grupos distintos de acordo com a AMOVA, uma vez que a variabilidade foi maior entre os grupos do que dentro dos grupos. Os iniciadores de ISSR (GACA)₄, (GTG)₅ e M13 e de ISSP EI1 foram utilizados para estudo de polimorfismo de 15 isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* de diferentes áreas e hospedeiros (Lima, 2005). Este autor observou que o iniciador (GACA)₄ foi mais sensível em detectar variabilidade intraespecífica entre isolados de *M. anisopliae*. Quatro isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* obtidos da cigarrinha *Mahanarva posticata* apresentaram 100% de similaridade para os iniciadores (GTG)₅ e EI1. Não houve correlação entre os grupos e hospedeiro ou origem geográfica. Marcadores SSR (Ma097, 099, 142, 145, 164, 165, 195, 210, 307, 325, 327 e 375) foram utilizados para estudos de polimorfismo de isolados de *M. anisopliae* de amostras de solo (80%) e de insetos (20%) de diferentes regiões do Chile (Velásquez et al., 2007) e de amostras de solo (floresta e agricultura) de países da Ásia e Europa (Freed et al., 2010). Os autores observaram a formação de três grupos e uma pequena variação entre as populações (18,5% e 19,35%) e não houve associação entre diversidade genética e local em que os isolados foram coletados.

Marcadores ISSR detectaram alto polimorfismo para isolados de *B. bassiana* que foram agrupados de acordo com a origem geográfica, mas não houve uma correlação entre estes isolados e seus hospedeiros (Aquino de Muro et al., 2005; Wang S. et al., 2005; Estrada et al., 2007) e para isolados de *E. muscae* (Lihme et al., 2009) e de *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber (Tymon & Pell, 2005). Wang S. et al.

(2005) observaram que a similaridade genética variou de 0,651 a 0,972 para 36 isolados de *B. bassiana*. Estrada et al. (2007) observaram que, num total de 11, sete apresentaram fragmentos exclusivos e que o iniciador 873 de ISSR distinguiu todos os isolados. Os estudos relacionados aos *introns* do grupo I buscam identificá-los e verificar o polimorfismo entre isolados de *M. anisopliae* por meio da análise filogenética (Mavridou et al., 2000; Márquez et al., 2006). Esta técnica também foi utilizada em estudos de polimorfismo de *B. bassiana* (Wang et al., 2003) e *B. brongniartii* (Neuvéglise et al., 1997) com sucesso.

Estudos sobre a diversidade genética em fungos entomopatogênicos que visam verificar a associação entre os isolados e o seu local de origem ou hospedeiro, ainda mostram resultados ambíguos. De acordo com Rehner (2005), a associação de um genótipo com um grupo de inseto poderia desenvolver-se numa escala geográfica local. A associação do genótipo (número e tamanho de fragmentos) de *M. anisopliae* com a cigarrinha *M. fimbriolata*, para os 37 isolados estudados neste trabalho, foi mais evidente utilizando a técnica ITS-RFLP, uma vez que todos os isolados apresentaram o mesmo padrão de fragmentos. Para os demais marcadores (ISSR e ISSP) foi observada uma diferenciação, indicando que existe variabilidade genética entre isolados da mesma origem geográfica e hospedeiro, que resultou provavelmente de mutações e ou recombinação parassexual. A variabilidade genética é uma característica importante para o controle biológico de *M. fimbriolata*, pois entre os isolados estudados alguns podem ser eficientes no controle deste inseto.

Os resultados indicam que os marcadores ISSR e ISSP permitem a caracterização e diferenciação dos isolados de *M. anisopliae*, principalmente para os iniciadores (GACA)₄ e (GTG)₅ que fornecem DNA *fingerprints* para alguns isolados. Estes marcadores podem ser usados com sucesso para diferenciação de isolados de *M. anisopliae* em estudos que visem sua detecção em laboratório e campo, permitindo o monitoramento de isolados após sua aplicação no campo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa (Doutorado) ao primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

4. PATOGENICIDADE DIFERENCIAL DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* E O CONTROLE DA CIGARRINHA-DA-RAIZ DA CANA-DE-AÇÚCAR *Mahanarva fimbriolata*¹

Resumo. Com o objetivo de se verificar a eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* Stal (Hemiptera: Cercopidae), foram estudados nove isolados obtidos de uma mesma região geográfica. As taxas de mortalidade acumulada confirmada e mortalidade acumulada corrigida foram calculadas para cada isolado. Com base na curva de mortalidade confirmada, os isolados URM5946, URM5951 e URM6033 foram considerados os melhores para serem utilizados em um programa de controle biológico de *M. fimbriolata*.

Palavras-chave: controle biológico, fungo entomopatogênico, *Metarhizium anisopliae*, *Mahanarva fimbriolata*.

Introdução

No Brasil, a monocultura da cana-de-açúcar forma a base das indústrias de exportação de açúcar e dos biocombustíveis (Alves et al., 2008a). A cigarrinha-da-raiz *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) causa sérios danos econômicos a esta cultura em regiões onde a colheita é mecanizada, principalmente na Região Sudeste e em alguns estados do Centro-oeste e do Nordeste (Dinardo-Miranda et al., 2006), e deste modo encontrar a melhor maneira de controlar este inseto é prioridade.

O controle biológico da cigarrinha-da-raiz utilizando *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin é uma alternativa ao uso de inseticidas químicos. Os benefícios do uso deste fungo também estão relacionados ao seu efeito contra a broca *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e sua inocuidade para inimigos naturais das cigarrinhas, como a vespa *Salpingogaster nigra* (Schiner) e a formiga predadora *Pheidole genalis* (Borgmeier) (Mendonça & Mendonça, 2005).

Vários trabalhos foram desenvolvidos, focalizando o isolamento e a seleção de

¹ Trabalho aceito para publicação: Tiago, P.V., Souza, H.M.L., Moysés, J.B., Oliveira, N.T., Luna-Alves Lima, E.A. Differential pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* and the control of sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, no prelo.

fungos entomopatogênicos que poderão ser eficientes controladores de insetos considerados pragas (Entz et al., 2008; Anand et al., 2009). Por exemplo, a patogenicidade de isolados de *M. anisopliae*, de diferentes hospedeiros e regiões do Brasil, foi testada contra a cigarrinha-da-raiz *M. fimbriolata* (Loureiro et al., 2005; Macedo et al., 2006). Em função da importância atual desta praga na cultura da cana-de-açúcar, a utilização de *Metarhizium* deverá aumentar, sendo importante a seleção de isolados mais promissores no controle desta praga. Por esta razão, o nosso trabalho teve por objetivo selecionar isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* com alta patogenicidade para ninfas de *M. fimbriolata*.

Material e Métodos

Procedência dos isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (URM5946, URM5947, URM5948, URM5949, URM5950, URM5951, URM5952, URM6033 e URM6034) foram obtidos de ninfas e adultos de *M. fimbriolata*, no município de Tangará da Serra, Mato Grosso, Brasil, 14°47'47"S – 57°49'07"W. Estes isolados foram depositados na Micoteca - URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Coleta das ninfas de *Mahanarva fimbriolata* para realização dos bioensaios

As ninfas foram coletadas em canavial isento de pulverizações com produtos fitossanitários, no município de Tangará da Serra, Mato Grosso, Brasil. Estas foram capturadas com o auxílio de pinça entomológica e colocadas em recipientes de vidro contendo alguns pedaços de folhas de cana e transportadas em caixa de isopor ao laboratório.

Bioensaios para avaliação da potencialidade dos isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* X *Mahanarva fimbriolata*

Foram realizados três bioensaios separadamente, cada um contendo um número diferente de isolados. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo (1, 2, 3, 4, 5, 6 dias de sobrevivência), com

nove isolados mais o controle, sendo os isolados dispostos nas parcelas e os dias de avaliação nas subparcelas, com cinco repetições.

O bioensaio 1 incluiu os isolados URM5946, URM5952, URM6034, no bioensaio 2 os isolados URM5947, URM5948, URM5949, URM5950 e no bioensaio 3 os isolados URM5951, URM6033.

Em cada caso foram avaliadas a mortalidade acumulada confirmada e a mortalidade acumulada corrigida após inoculação. A mortalidade confirmada corresponde a porcentagem dos insetos nos quais a esporulação do patógeno foi confirmada e a mortalidade corrigida é calculada pela fórmula de Abbott (1925), retirando os indivíduos que morreram de causas naturais (controle) do cálculo das proporções de morte daqueles que foram submetidos a concentrações específicas do fungo (mortalidade total).

Os isolados foram inoculados em Batata Dextrose Ágar (BDA) contido em placas de Petri e acondicionados em BOD a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias. Posteriormente, foram preparadas as suspensões de conídios em água destilada esterilizada + Tween 80 (0,03% v/v) na concentração de 1×10^8 conídios/mL e um tratamento controle que continha água destilada esterilizada + Tween 80 (0,03% v/v). As ninfas de cigarrinhas foram imersas nas suspensões de conídios por 10 segundos e, em seguida, foram transferidas para caixas plásticas transparentes (34 cm x 22 cm x 12 cm), contendo duas folhas de cana-de-açúcar (8 cm de comprimento) lavadas com água destilada esterilizada, e mantidas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12 horas e Umidade Relativa (UR) de $70 \pm 10\%$. Para cada tratamento, foram utilizadas cinco caixas plásticas, cada uma contendo 10 ninfas, totalizando 50 ninfas. A mortalidade foi acompanhada diariamente até o sexto dia após a imersão e as ninfas mortas foram colocadas individualmente em placas de Petri com um pedaço de algodão umedecido, configurando uma câmara úmida, e foram novamente levadas a BOD para verificar o crescimento micelial e conidiogênese nos cadáveres.

Análise Estatística

A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para avaliar as diferenças de mortalidade acumulada (confirmada e corrigida) após a transformação dos dados em $\text{ARCSEN } \sqrt{(x/100)}$. A ANCOVA permite avaliar diferenças de inclinação (paralelismo) e de nível (coincidência) entre as curvas de regressão obtidas em cada bioensaio. No caso em que não houve paralelismo ($p < 0,05$), os isolados foram testados 2 x 2 a fim de localizar as

diferenças de inclinação e para os pares que apresentaram curvas paralelas ($p > 0,05$) foi testada a diferença entre as interseções no eixo Y. No caso em que houve paralelismo ($p > 0,05$) foi testada a diferença de interseção Y e quando as diferenças foram significativas foi utilizado o teste de Tukey para identificar estas diferenças de interseção (Zar, 2009).

Resultados

Não houve paralelismo das retas de regressão obtidas para os isolados estudados no bioensaio 01 ($F_{(2;84)} = 13,239$, $p = 0,000010$) (Figura 1a) e no bioensaio 02 ($F_{(3;112)} = 2,707$, $p = 0,0487$) (Figura 1b), indicando a existência de diferenças de mortalidade acumulada confirmada entre os tratamentos testados. No bioensaio 01, os isolados URM5946 e URM6034 causaram a maior taxa de mortalidade confirmada e não diferiram entre si, pois, apresentaram retas de regressão com inclinação semelhante ($F_{(1;56)} = 1,194$, $p = 0,279$, $b_{\text{URM5946}} = 0,1688$, $b_{\text{URM6034}} = 0,1359$), porém apresentaram diferenças de interseção ($F_{(1;57)} = 11,300$, $p = 0,0014$). As diferenças de inclinação das retas ocorreram entre os isolados URM5946 e URM5952 ($F_{(1;56)} = 31,022$, $p = 0,000001$) e os isolados URM6034 e URM5952 ($F_{(1;56)} = 15,013$, $p = 0,0003$), visto que o isolado URM5952 apresentou o menor coeficiente de regressão ($b_{\text{URM5952}} = 0,0381$) (Figura 1a).

No bioensaio 02, o isolado URM5948 causou maior mortalidade confirmada, comparativamente ao isolado URM5947, apresentando diferenças entre os coeficientes de regressão ($F_{(1;56)} = 7,009$, $p = 0,010$, $b_{\text{URM5948}} = 0,1524$, $b_{\text{URM5947}} = 0,0781$). A mortalidade registrada foi igual para os isolados URM5948, URM5949 e URM5950, apresentando retas de regressão com inclinação semelhante ($F_{(2;84)} = 0,90$, $p = 0,410$, $b_{\text{URM5949}} = 0,1264$, $b_{\text{URM5950}} = 0,1157$), não sendo observadas diferenças de interseção ($F_{(2;86)} = 1,1856$, $p = 0,310$) (Figura 1b).

Houve paralelismo das retas de regressão obtidas para os isolados estudados no bioensaio 03 ($F_{(1;56)} = 1,755$, $p = 0,190$, $b_{\text{URM5951}} = 0,1829$, $b_{\text{URM6033}} = 0,1368$), indicando a existência de um padrão de mortalidade acumulada confirmada para os isolados URM5951 e URM6033 (Figura 1c). Estes isolados atingiram 50% de mortalidade acumulada confirmada no sexto dia, e assim como não foram observadas diferenças entre os coeficientes de regressão, também não foram observadas diferenças entre as interseções das curvas ($F_{(1;57)} = 0,516$, $p = 0,475$).

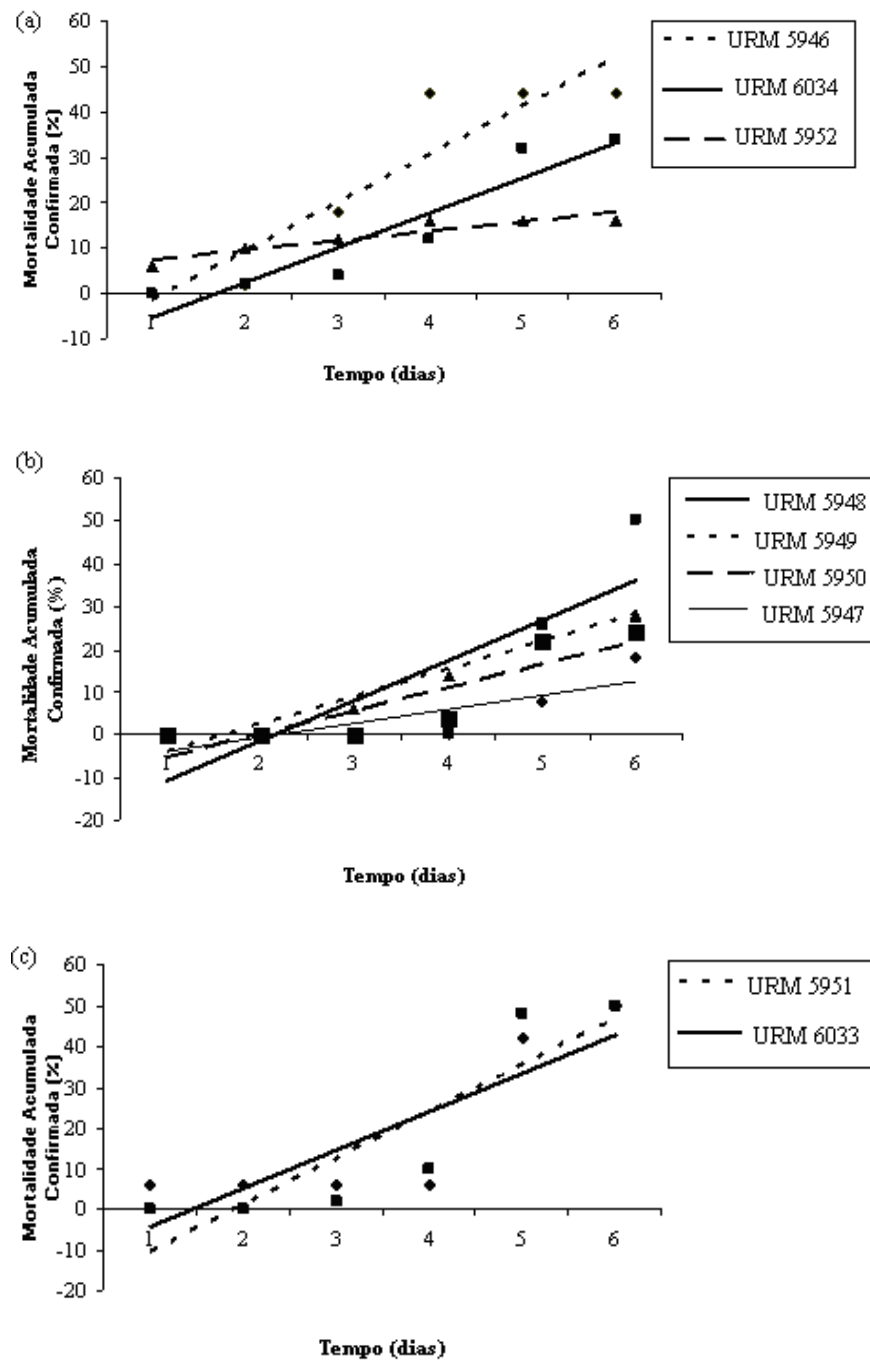


Figura 1 - Mortalidade acumulada confirmada (%) de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* ao longo de seis dias após aplicação de isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. a) Bioensaio 01: ---♦--- URM5946; —■— URM6034; —▲— URM5952. b) Bioensaio 02: —■— URM5948; ---▲--- URM5949; —■— URM5950; —♦— URM5947. c) Bioensaio 03: ---■--- URM5951; —♦— URM6033. Dados originais; para análise estatística foram transformados em $\text{ARCSEN } \sqrt{(x/100)}$.

A resistência do inseto ao isolado URM5952 foi inicialmente menor, seguido dos isolados URM5946 e URM6034, mas somente os dois últimos apresentaram uma boa eficiência no controle das ninfas (Figura 1a). No bioensaio 02 foi observado inicialmente que as ninfas mostraram maior suscetibilidade ao isolado URM5949 e menor ao isolado URM5948, porém ambos atingiram eficiência final semelhante (Figura 1b). No bioensaio 03, apesar dos isolados URM5951 e URM6033 apresentarem comportamento semelhante, as ninfas tiveram, inicialmente, uma suscetibilidade maior ao isolado URM6033 (Figura 1c). No tratamento controle, as ninfas que morreram durante os dias de avaliação não apresentaram esporulação, assim, a mortalidade acumulada confirmada foi zero nos três bioensaios.

A eficiência dos isolados estudados nos três bioensaios também foi apresentada na forma corrigida. Não houve paralelismo das retas de regressão ($F_{(2;84)} = 5,163$, $p = 0,0077$) no bioensaio 01 (Figura 2a). A eficiência dos isolados foi maior na forma corrigida comparada a confirmada, mas nos dois casos os isolados URM5946 e URM6034 se destacaram (Figuras 1a; 2a).

Houve paralelismo das retas de regressão obtidas para os isolados estudados no bioensaio 02 ($F_{(3;112)} = 1,497$, $p = 0,210$, $b_{\text{URM5947}} = 0,2025$, $b_{\text{URM5948}} = 0,2141$, $b_{\text{URM5949}} = 0,2354$, $b_{\text{URM5950}} = 0,1630$) (Figura 2b) e no bioensaio 03 ($F_{(1;56)} = 0,142$, $p = 0,708$, $b_{\text{URM5951}} = 0,2613$, $b_{\text{URM6033}} = 0,2321$) (Figura 2c), indicando a existência de um padrão de mortalidade acumulada corrigida. No bioensaio 02, os isolados apresentaram retas de regressão com inclinação semelhante, mas foram observadas diferenças de interseção ($F_{(3;115)} = 7,775$, $p = 0,00009$), sendo que o isolado URM5949 diferiu dos demais (Figura 2b). Os isolados não diferiram em termos de mortalidade acumulada corrigida neste bioensaio. No bioensaio 03, a eficiência dos isolados foi maior na forma corrigida comparada a confirmada, mas nos dois casos não houve diferença significativa entre os isolados (Figuras 1c; 2c).

As curvas de mortalidade confirmada foram utilizadas como critério para a seleção dos isolados. Assim, os isolados URM5946 (bioensaio 01), URM5951 e URM6033 (bioensaio 03) apresentaram características promissoras para serem utilizados em um programa de controle biológico de *M. fimbriolata*. Os fungos que causaram baixa mortalidade confirmada e alta mortalidade corrigida não são recomendados para o controle de ninfas de *M. fimbriolata*.

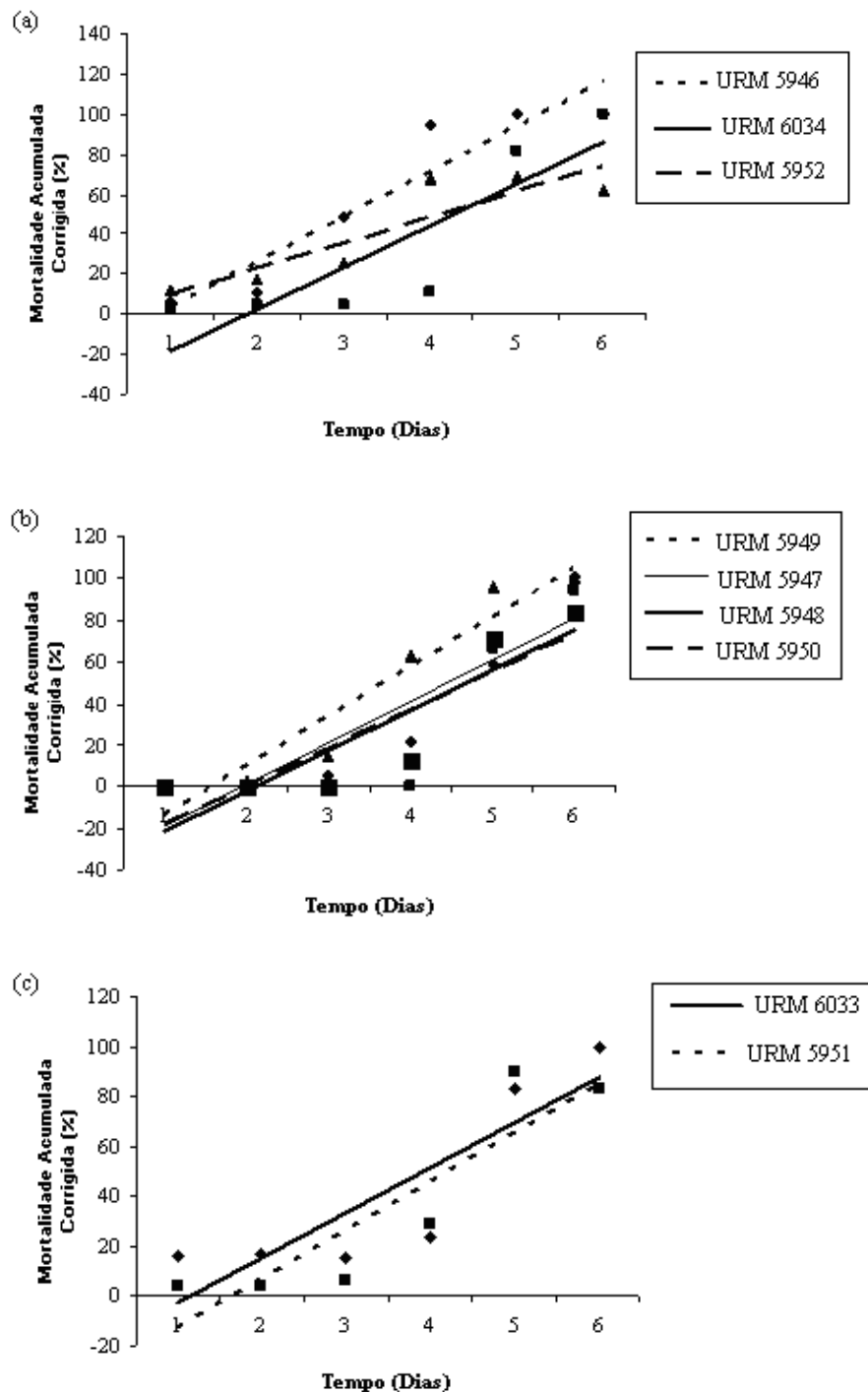


Figura 2 - Mortalidade acumulada corrigida (%) de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* ao longo de seis dias após aplicação de isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. a) Bioensaio 01: ---♦--- URM5946; —■— URM6034; —▲— URM5952. b) Bioensaio 02: ---▲--- URM5949; —♦— URM5947; —■— URM5948; —■— URM5950. c) Bioensaio 03: ---■--- URM5951; —♦— URM6033. Dados originais; para análise estatística foram transformados em $\text{ARCSIN } \sqrt{(x/100)}$.

Discussão

Os nove isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* estudados apresentaram valores baixos e médios de mortalidade após seis dias (16-50%). A seleção de fungos entomopatogênicos se utiliza de isolados obtidos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas (Ihara et al., 2001; Samuels et al., 2002; Loureiro et al., 2005) porque acredita-se que os isolados exóticos poderão ser mais virulentos. Contudo, Loureiro et al. (2005) observaram baixos valores de mortalidade confirmada quando compararam 27 isolados de *M. anisopliae* obtidos de cigarrinhas de diferentes regiões do Brasil e apenas dois isolados apresentaram mortalidade de 80 - 88% no sexto dia.

Outros trabalhos envolvendo a patogenicidade de *M. anisopliae*, testada contra vários insetos da ordem Hemiptera apresentaram resultados bastante heterogêneos. *M. anisopliae* causou 87,1% de mortalidade confirmada contra *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae), vetor da clorose variegada dos citros (Pria Júnior et al., 2008). Com o percevejo *Cyrtomenus bergi* (Froeschner) (Hemiptera: Cydnidae) os valores de mortalidade confirmada não excederam 55% (Jaramillo & Borgemeister, 2006). Para a cochonilha-da-raiz *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae), a maioria dos isolados de *M. anisopliae* causou mortalidade confirmada entre 30% e 50% (Andaló et al., 2004). Estes trabalhos utilizaram a análise de variância (ANOVA) e o teste de médias dos dados de mortalidade obtidos no último dia de avaliação para determinar os isolados mais eficientes.

A análise de covariância permitiu a escolha dos isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* mais virulentos ao se testar o paralelismo entre as curvas em função do tempo. Assim, os isolados mais virulentos URM5946, URM5951, URM6033 foram aqueles que causaram mortalidade, em menor tempo e com uma boa eficiência final.

Os dados de mortalidade confirmada, analisados ao longo do tempo, permitiram verificar diferenças na suscetibilidade do inseto a cada isolado. Exceto para os isolados URM5952 (bioensaio 01) e URM5947 (bioensaio 02), a suscetibilidade das ninfas estava diretamente relacionada aos isolados que causaram a maior taxa de mortalidade confirmada final. Este fato, geralmente, está associado à virulência que reflete a capacidade do patógeno de bloquear a resistência natural do inseto, invadir e multiplicar-se nos tecidos do hospedeiro (Thomas & Elkinton, 2004).

A mortalidade confirmada diferenciou os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae*

quanto a sua eficiência no controle de ninfas de *M. fimbriolata* nos bioensaios 01 e 02. A variação nos valores de mortalidade confirmada, possivelmente, ocorreu devido à variabilidade genética do patógeno, a utilização de uma população heterogênea de insetos e ao estresse que estes insetos sofreram ao serem retirados das condições de campo. É possível que alguns insetos não apresentaram a esporulação do entomopatógeno, em função de não terem sido mortos pela ação do fungo, e que outros morreram antes mesmo do fungo iniciar a infecção. Segundo Loureiro et al. (2005), em alguns casos pode ter ocorrido uma septicemia generalizada causada por bactérias que interferiram no crescimento vegetativo do fungo no interior dos insetos.

Os isolados que causaram maior taxa de mortalidade acumulada confirmada apresentaram virulência moderada, que é uma característica importante quando se pretende utilizar os patógenos, usando as estratégias de introdução inoculativa ou de incrementação.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, à Fundação de Amparo a Pesquisa de Mato Grosso (FAPEMAT) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Um agradecimento especial ao Dr. Paulo Jorge Parreira dos Santos, do Departamento de Zoologia da UFPE, pela contribuição na análise estatística e para o Dr. David Bousfield (Ganesha Associates, Cambridge, UK) pela análise crítica deste manuscrito.

5. PERSISTÊNCIA E EFEITO DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE FÚNGICA DO SOLO¹

Resumo. Com os objetivos de se verificar a persistência de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin URM5951 no solo e o efeito da sua introdução na estrutura da comunidade fúngica, uma suspensão de conídios foi pulverizada na superfície do solo obtido no campo. O experimento foi realizado em vasos, cada um contendo 3 Kg de solo, onde foi introduzida uma plântula de cana-de-açúcar (cultivar RB867515) e mantidos em casa de vegetação. Aos 15, 30, 60 e 90 dias após a aplicação do fungo, amostras de solo foram coletadas para determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e para a extração de DNA. O efeito sobre a estrutura da comunidade fúngica foi analisado pela técnica PCR-DGGE. Observou-se uma alta similaridade entre as amostras de solo inoculadas com *M. anisopliae* var. *anisopliae* e as amostras controle em todos os tempos estudados. O isolado URM5951 apresentou uma persistência até 60 dias e aparentemente não interferiu na comunidade fúngica do solo nas condições ensaiadas, sendo estas características desejáveis em processos de seleção de fungos entomopatogênicos.

Palavras-chave: fungo entomopatogênico, PCR-DGGE, gene 18S do rDNA.

Introdução

Um número expressivo de micoinseticidas e micoacaricidas é utilizado no mundo e os produtos mais comercializados são à base de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Isaria fumosorosea* Wize e *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch (Faria & Wraight, 2007). No Brasil, *M. anisopliae* é usado em grande escala para controlar um complexo de cigarrinhas, incluindo *Mahanarva fimbriolata* Stal e *M. posticata* Stal em cultivos de cana-de-açúcar e *M. fimbriolata*, *Deois flavopicta* Stal e *Notozulia entreriana* Berg em pastagens (Alves, 1998b; Alves et al., 2008a). Produtos à base desse fungo representam 55% dos produtos comercialmente disponíveis ou em processo de registro, seguido por *B. bassiana* (30%), *Lecanicillium* spp.

¹ Trabalho a ser submetido para publicação: Tiago, P.V., Carneiro-Leão, M.P., Malosso, E., Oliveira, N.T., Luna-Alves Lima, E.A. Persistence and effect of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* on soil fungal community structure. *BioControl*.

(7,5%) e *Sporothrix insectorum* Hoog & Evans (7,5%) (Michereff Filho et al., 2009).

A introdução de micro-organismos exógenos em ambientes naturais e em agroecossistemas pode afetar a comunidade microbiana do solo e, conseqüentemente, os diversos processos ecológicos destes ambientes. A técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) é aplicada em estudos com diversos enfoques da diversidade microbiana, como por exemplo o efeito de pesticidas, resíduos de petróleo, diferentes manejos agrícolas e variação da população microbiana em cultivos de plantas transgênicas e não transgênicas (Xavier et al., 2004).

O efeito da introdução de fungos entomopatogênicos na comunidade microbiana do solo é um aspecto ecológico ainda pouco estudado. Em um recente estudo, Schwarzenbach et al. (2009) verificaram, por meio da técnica de análise do espaço ribossomal interno (RISA – *Ribosomal Internal Spacer Analysis*), que *B. brongniartii* causou um efeito pequeno e transitório na estrutura da comunidade fúngica do solo em microcosmos. Os demais estudos referentes à introdução de micro-organismos em agroecossistemas estão relacionados, principalmente, à introdução de bactérias promotoras do crescimento de plantas, como *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) Priest Goodfellow Shute & Berkeley e *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner e fungos micorrízicos, como *Glomus intraradices* Schenck & Smith, *G. mosseae* (Nicolson & Gerd.) Gerdemann & Trappe e *Pisolithus albus* (Cooke & Massee) Priest (Marschner et al., 2001; Wamberg et al., 2003; Assigbetse et al., 2005; Herschkovitz et al., 2005a ; b; Correa et al., 2009). Estes trabalhos demonstraram que a introdução de micro-organismos exógenos pode, em alguns casos, modificar a estrutura da comunidade microbiana do solo e da rizosfera. Portanto, é importante conhecer a relação entre os micro-organismos e o ambiente por meio do estudo da diversidade estrutural das comunidades microbianas e como elas respondem aos vários distúrbios naturais ou antrópicos.

Os objetivos deste trabalho foram verificar a persistência de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951 no solo e o efeito da sua introdução na estrutura da comunidade fúngica, por meio do perfil de bandas de PCR-DGGE.

Material e Métodos

Procedência do isolado de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Foi utilizado *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951, obtido de *M. fimbriolata*, no município de Tangará da Serra-MT, Brasil. Este isolado foi depositado na Micoteca - URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. O isolado URM 5951 foi selecionado preliminarmente como potencial agente de controle biológico de *M. fimbriolata* e por apresentar uma boa produção de conídios em arroz, meio comumente utilizado para a produção de *M. anisopliae* em escala comercial. O isolado foi cultivado em saco plástico contendo arroz parboilizado esterilizado (100 g de arroz/50 mL de água destilada) e incubado a 28°C por 10 dias.

Coleta do solo

O solo utilizado foi coletado em fevereiro de 2010, na profundidade de 0 a 20 cm, em um cultivo de cana-de-açúcar na Usina Cruangi, no município de Timbaúba-PE, 7°33'20"S - 35°16'49,4"W. Após secagem a 28°C \pm 4°C, o solo foi destorreado, peneirado em malha de 3 mm e armazenado em saco plástico até o momento de uso. A análise físico-química foi realizada nos Laboratórios de Física e Fertilidade do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise físico-química do solo coletado na Usina Cruangi, Timbaúba-PE

Composição granulométrica (%)				Classe textural	P mg/dm ³	pH (H ₂ O)	K	Al	Ca	Mg
Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila							
45	23	17	15	FA*	>40	6,5	0,33	0	2,5	1,55

*FA= Franco Arenoso

Avaliação da persistência de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* no solo

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo (15, 30, 60 e 90 dias após aplicação do fungo), com um isolado mais controle, sendo estes dois últimos dispostos nas parcelas e os dias de avaliação nas subparcelas, com sete repetições.

A avaliação da persistência de *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi realizada em vasos, cada um contendo 3 Kg de solo, onde foi introduzida uma plântula de cana-de-açúcar (cultivar RB867515) e mantidos em casa de vegetação. O solo de cada vaso recebeu água

destilada esterilizada em quantidade suficiente para atingir 40% de capacidade de retenção de água, de acordo com o método descrito por Monteiro & Frighetto (2000). As amostras de solo de cada vaso foram inoculadas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) para verificar a pré-existência de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, sendo comprovada a ausência do mesmo. Após 15 dias de introdução das mudas de cana-de-açúcar nos vasos, uma suspensão de 15×10^8 conídios do isolado URM5951 foi pulverizada na superfície do solo dos vasos correspondentes ao tratamento introdução do fungo. Nos vasos correspondentes ao controle, foi aplicada somente água destilada esterilizada. Para a manutenção da umidade, os vasos foram pesados diariamente e, quando necessário, foi adicionada água destilada esterilizada.

Amostras de solo foram coletadas aos 15, 30, 60 e 90 dias após a aplicação do fungo. Em cada avaliação, uma amostra de 25 g de solo úmido, composta de cinco subamostras colhidas na profundidade de 0 a 10 cm de cada vaso, foi suspendida em 225 mL de água destilada esterilizada. Foram realizadas diluições seriadas, das quais 10^{-4} (15 e 30 dias) e 10^{-3} (60 e 90 dias) alíquotas de 1mL foram inoculadas em BDA, acrescido de Tetraciclina (250mg L^{-1}). As placas foram incubadas a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante cinco dias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias de *M. anisopliae* var. *anisopliae* - UFC/g solo.

Análise da estrutura da comunidade fúngica do solo por PCR-DGGE

A análise da comunidade fúngica das amostras de solo, coletadas aos 15, 30, 60 e 90 dias após a aplicação de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, foi realizada pela técnica de separação de fragmentos do gene 18S do rDNA por DGGE. A extração do DNA foi realizada segundo o método de Griffiths et al. (2000). O DNA foi precipitado em 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M e 0,6 volumes de isopropanol em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida o DNA foi seco a 37°C e ressuspendido em água ultrapura e sua concentração foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, a 3V/cm em tampão de corrida Tris - ácido acético - EDTA (TAE) 1X, por comparação com o marcador de peso molecular DNA de fago lambda (Invitrogen Life Technologies).

As reações de amplificação da região 18S do rDNA de fungos das amostras de solo foram realizadas em um volume final de 30 μL contendo tampão de reação (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; NH_4), MgCl_2 2,0 mM, dNTP 0,20 mM, iniciadores FR1_(GC) e FF390 (Vainio

& Hantula, 2000) 0,40 μM cada, Taq DNA polimerase 0,04 U/ μL (Invitrogen Life Technologies) e 25 ng de DNA. A amplificação ocorreu com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 minuto, 50°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos (30 ciclos) e extensão final a 72°C por 10 minutos (1 ciclo). O produto da amplificação (aproximadamente 400 pb) foi visualizado em gel de agarose (0,8%).

A análise por DGGE da região amplificada foi realizada conforme Malosso et al. (2006). Os produtos de PCR foram aplicados em gel vertical de poliacrilamida (6%) com gradiente desnaturante de uréia/formamida de 30 – 50%, a corrida ocorreu a 220 V por 220 minutos e a 60°C. O gel foi corado com SYBR Green por 30 minutos e visualizado em transluminador de ultravioleta e fotografado utilizando máquina digital.

Análise Estatística

Os dados de persistência do isolado URM5951 no solo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, após a transformação dos dados em $\sqrt{(x + 0,5)}$. Foi utilizado o programa Assistat 7.5 beta (Silva & Azevedo, 2009).

A matriz binária, baseada nos perfis dos fragmentos obtidos pela técnica DGGE, foi gerada pelo programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories). Estes dados foram analisados pelo programa NTSYSpc 2.1 (Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs) segundo Rohlf (2000). As variáveis binárias foram utilizadas para a construção de uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Dice, e a partir desta matriz foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average*), onde também foi calculada a matriz cofenética.

Resultados e Discussão

Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* URM5951 apresentou uma redução no número de UFC ao longo do tempo estudado, que variou de 19,49 a $0,23 \times 10^3$ UFC g^{-1} solo (Tabela 2). Foram observadas diferenças entre as amostras de solo que receberam *M. anisopliae* var. *anisopliae* e o controle aos 15, 30 e 60 dias após a aplicação do mesmo. O maior número de UFC foi observado aos 15 dias que diferiu dos demais tempos e não

foram verificadas diferenças entre as UFC nos tempos 30 e 60 dias.

O declínio no número de colônias de *M. anisopliae* em solo esterilizado foi observado por Lanza et al. (2004) e Guerra et al. (2009) até 120 dias, sob condições controladas de temperatura e umidade em laboratório. Correa & Azevedo (1986) observaram que solos esterilizados proporcionaram uma maior sobrevivência dos conídios de *M. anisopliae* que os solos não esterilizados.

Segundo Lanza et al. (2004), a sobrevivência do fungo foi influenciada pelo tipo e densidade do solo e a maior sobrevivência ocorreu em solos de textura areno-argilosa e que apresentaram valores médios de densidade. Neste trabalho, o solo que é do tipo franco arenoso pode ter contribuído para a sobrevivência do fungo aos 60 dias após a aplicação. Observou-se um aumento da compactação do solo ao longo do tempo, devido à adição diária de água, que pode ter contribuído para a redução das UFC aos 90 dias.

Em um estudo de campo visando o controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* Stal em arroz irrigado, Martins et al. (2004) observaram Unidades Formadoras de Colônias no solo do arrozal até 216 dias após a aplicação de *M. anisopliae*, diferentemente dos resultados obtidos em trabalhos desenvolvidos em condições controladas. Estes autores também observaram que as formas de aplicação, conídios em suspensão e veiculados em grãos de arroz esterilizados, também influenciaram na quantidade de UFC observadas, sendo maior em amostras de solos das parcelas tratadas com grão de arroz. Nesse sentido, são vários os fatores que podem influenciar na sobrevivência de *M. anisopliae* no solo e devem ser observados quando da utilização em massa de fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos.

Tabela 2 - Persistência de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM5951 no solo após 15, 30, 60 e 90 dias de aplicação

Isolado	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
UFC* x 10 ³ g ⁻¹ solo				
URM5951	19,49 aA	5,7 aB	2,71 aB	0,23 aC
Controle	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 aA

* UFC: Unidade Formadora de Colônias. Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados originais; para análise estatística foram transformados $\sqrt{(x+0,5)}$.

Os dendrogramas gerados pelos perfis dos fragmentos obtidos pela técnica DGGE revelaram dois grupos aos 15, 30, 60 e 90 dias (Figuras 1a; 2a; 3a; 4a). Os dois grupos observados aos 15 dias após aplicação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentaram 80% de similaridade (Figura 1a). O grupo 1 apresentou dois subgrupos com 83% de

similaridade, o primeiro incluiu todas as amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae* e o segundo subgrupo apresentou três amostras de solo controle (C1, C2, C3). As demais amostras do controle (C4, C5, C6 e C7) foram agrupadas no grupo 2.

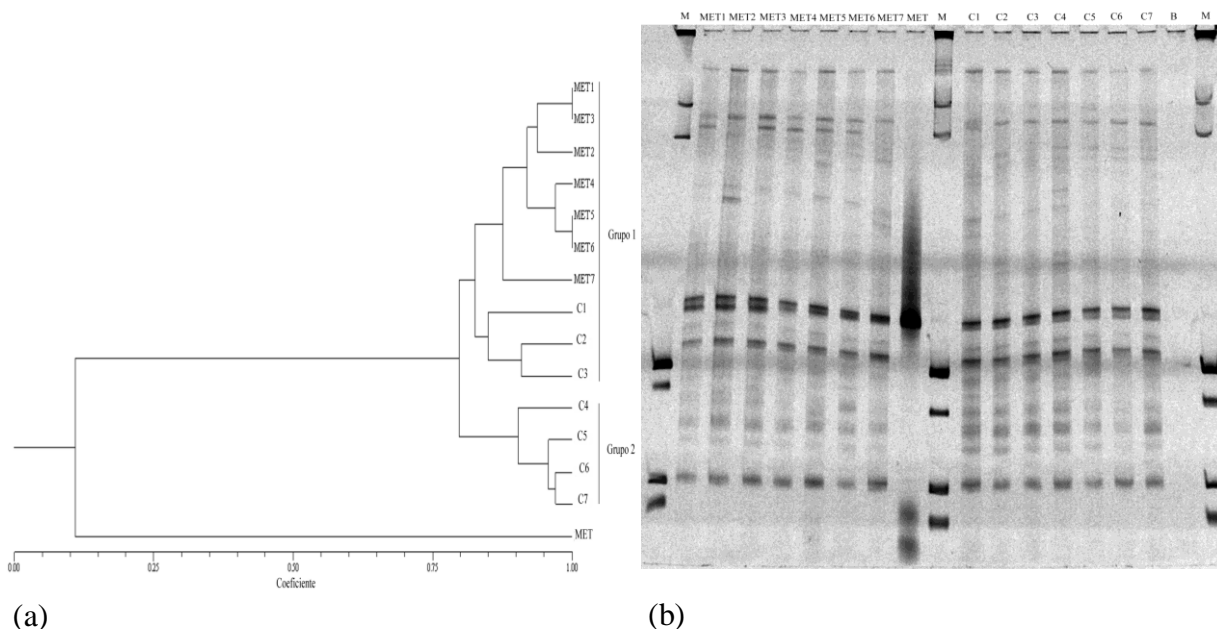


Figura 1- Estrutura da comunidade fúngica com base nos perfis de fragmentos do rDNA 18S de amostras de solo após 15 dias de aplicação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM5951. a – dendrograma de similaridade genética obtido pela análise de DGGE, $r = 99,28\%$; b – Perfil eletroforético de DGGE. Na pista M, marcador de peso molecular 1 Kb; Nas pistas MET1, MET2, MET3, MET4, MET5, MET6, MET7 = réplicas das amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae*; MET = DNA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 = amostras de solo do controle; B = branco.

Os dois grupos observados aos 30 dias após aplicação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentaram 75% de similaridade (Figura 2a). O grupo 1 apresentou quatro amostras de solo inoculadas com o fungo (MET1, MET2, MET4, MET5). O grupo 2 apresentou dois subgrupos com aproximadamente 82% de similaridade, o primeiro incluiu amostras de solo inoculadas (MET3, MET6 e MET7) e amostras de solo controle (C1, C2, C6, C7) e o segundo subgrupo incluiu as demais amostras de solo controle (C3, C4 e C5).

Os grupos formados aos 60 e 90 dias após aplicação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentaram 90% e 82% de similaridade, respectivamente (Figuras 3a; 4a). Aos 60 dias, o grupo 1 apresentou dois subgrupos com aproximadamente 95% de similaridade, o primeiro incluiu as amostras MET1, MET2 e MET3 e o segundo subgrupo

incluiu as demais amostras de solo com o fungo (MET4, MET5, MET6 e MET7). O grupo 2 incluiu todas as amostras de solo controle com 100% de similaridade (Figura 3a). Aos 90 dias, todas as amostras dos grupos 1 (amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae*) e 2 (amostras de solo controle) apresentaram 100% de similaridade (Figura 4a).

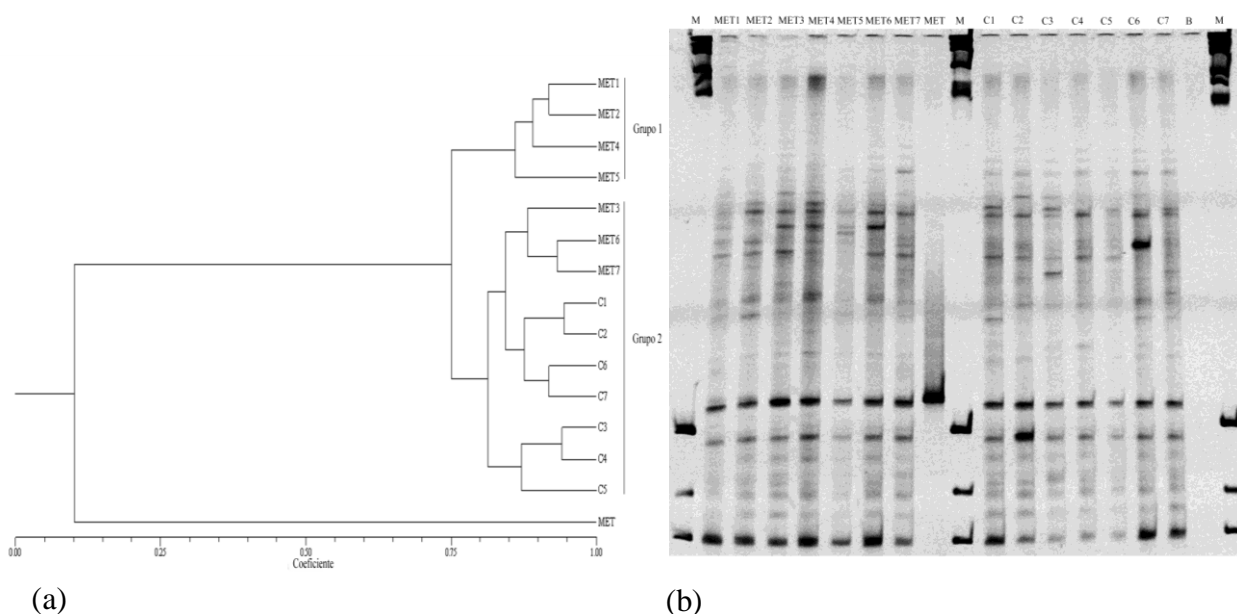


Figura 2 – Estrutura da comunidade fúngica com base nos perfis de fragmentos do rDNA 18S de amostras de solo após 30 dias de aplicação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM5951. a – dendrograma de similaridade genética obtido pela análise de DGGE, $r = 97,89\%$; b – Perfil eletroforético de DGGE. Na pista M, marcador de peso molecular 1 Kb; Nas pistas MET1, MET2, MET3, MET4, MET5, MET6, MET7 = réplicas das amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae*; MET = DNA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 = amostras de solo do controle; B = branco.

Foi verificada, portanto, uma alta similaridade entre as amostras de solo inoculadas com *M. anisopliae* var. *anisopliae* e as amostras controle em todos os tempos estudados, ocorrendo inclusive o agrupamento de algumas amostras inoculadas e controle nos dois primeiros tempos estudados. Semelhantemente, Schwarzenbach et al. (2009) verificaram por meio da técnica RISA que a introdução do fungo entomopatogênico *B. brongniartii* causou pouco e transitório efeito na comunidade fúngica do solo em microcosmos. Observou-se também que o inseticida Carbofuran apresentou inicialmente pouco efeito na comunidade, mas seu efeito aumentou significativamente no final do experimento. Estes resultados, juntamente com os apresentados neste trabalho, reforçam a importância e

segurança da utilização destes fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico de insetos.

A introdução de bactérias promotoras de crescimento de plantas, como *B. amyloliquefaciens* e *A. brasilense*, também não apresentaram efeito sobre a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera da soja [*Glycine max* (Linnaeus) Merriall] e do milho (*Zea mays* Linnaeus), em vista da alta similaridade entre as amostras inoculadas e controle (Herschkovitz et al., 2005a; b; Correa et al., 2009). Entretanto, a pulverização da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) em pimenta (*Capsicum annum* Linnaeus) pode ter causado a mudança da estrutura da comunidade bacteriana na filosfera dessa planta (Zhang et al., 2008).

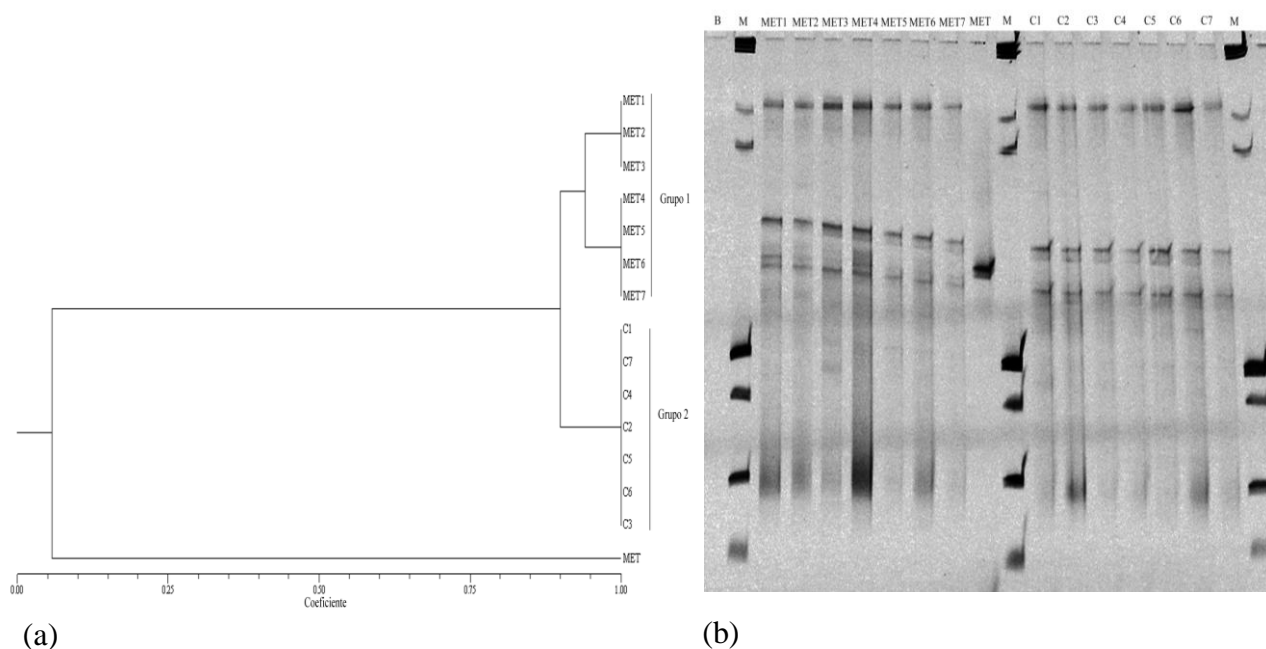


Figura 3 – Estrutura da comunidade fúngica com base nos perfis de fragmentos do rDNA 18S de amostras de solo após 60 dias de aplicação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM5951. a – dendrograma de similaridade genética obtido pela análise de DGGE, $r = 99,20\%$; b – Perfil eletroforético de DGGE. Na pista B = branco; Na pista M = marcador de peso molecular 1 Kb; Nas pistas MET1, MET2, MET3, MET4, MET5, MET6, MET7 = réplicas das amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae*; MET = DNA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 = amostras de solo do controle.

Outro fato relevante foi que aos 15 e 30 dias após a aplicação do fungo, observou-se um maior número de fragmentos e variação entre as repetições de cada tratamento, enquanto que nos dois últimos tempos estudados ocorreu uma diminuição no número de

fragmentos e o perfil destes tornaram-se mais similares entre as réplicas de cada tratamento (Figuras 1b; 2b; 3b; 4b). Este fato possivelmente ocorreu devido a compactação do solo e perda de nutrientes ao longo dos tempos estudados e estas condições podem ter favorecido a predominância de fungos mais competitivos e dominantes. A diminuição do número de fragmentos e maior similaridade do perfil destes fragmentos ao longo do tempo também foram observadas em amostras de solo rizosférico de ervilha (*Pisum sativum* Linnaeus) com e sem micorrizas (*G. intraradices*) (Wamberg et al., 2003). Diferindo do que foi observado no presente trabalho, o inóculo de fungos micorrízicos (*G. mosseae* e *G. intraradices*) e solubilizadores de fosfato (*Aspergillus niger* Van Thieghem e *Penicillium oxalicum* Currie & Thom) pode ter alterado a comunidade bacteriana na rizosfera de plantas como milho e soja, limitando ou aumentando o crescimento de algumas bactérias (Marschner et al., 2001; Wang et al., 2007).

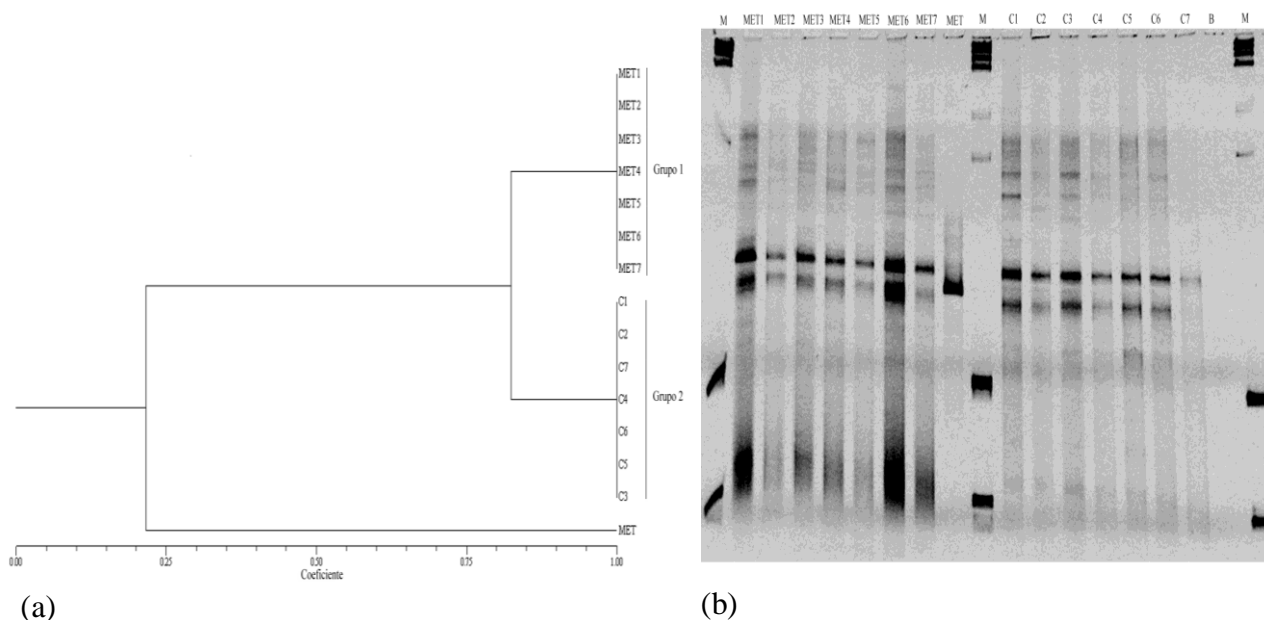


Figura 4 – Estrutura da comunidade fúngica com base nos perfis de fragmentos do rDNA 18S de amostras de solo após 90 dias de aplicação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM5951. a – dendrograma de similaridade genética obtido pela análise de DGGE, $r = 99,87\%$; b – Perfil eletroforético de DGGE. Na pista M, marcador de peso molecular 1 Kb; Nas pistas MET1, MET2, MET3, MET4, MET5, MET6, MET7 = réplicas das amostras de solo com *M. anisopliae* var. *anisopliae*; MET = DNA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 = amostras de solo do controle; B = branco.

A estrutura da comunidade fúngica do solo, avaliada por DGGE, não foi influenciada pela presença de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM5951 no solo, e pouca

variação do padrão de distribuição dos fragmentos entre os tratamentos é peculiar a este tipo de amostra. Portanto, este isolado apresentou uma considerável persistência nas condições de casa de vegetação e demonstrou não interferir na comunidade fúngica do solo em que foi introduzido, sendo estas características importantes para o processo de seleção de fungos utilizados em controle biológico de pragas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa (Doutorado) ao primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

6. MORFOLOGIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*¹

Resumo. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar e analisar os aspectos morfológicos de 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* e identificá-los ao nível de variedade, utilizando iniciadores específicos. Para a análise das estruturas microscópicas foi empregada a técnica de cultura sob lamínula em BDA, as 48, 72, 96 e 120 horas de crescimento. A caracterização morfológica macroscópica foi baseada na forma e na coloração da colônia fúngica após crescimento em meio BDA. A amplificação com os iniciadores ITSmet/ITS4 confirmou que os isolados são *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Todos os isolados estudados produziram apressórios em alguma fase de seu crescimento. Os blastosporos foram observados com 24 e/ou 48 horas de crescimento, com exceção dos isolados URM6098, URM6101, URM6104, URM6105 e URM6132 que produziram esta estrutura com 96 horas, enquanto que para os isolados URM5946, URM5949, URM5950, URM6099, URM6106 e URM6115 estas estruturas não foram observadas. Os isolados URM5949, URM6096, URM6131 e URM6132 apresentaram conidióforos jovens em 48 horas e URM5950, URM6098, URM6106 e URM6112 não apresentaram conidióforos jovens e ramificados em 120 horas. As colônias apresentaram formas e coloração variadas. As variações morfológicas comprovam a grande variabilidade genética intraespecífica e servem de base para a diferenciação dos isolados.

Palavras-chave: apressórios, blastosporos, conidióforos, conídios.

Introdução

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin é utilizado para o controle de algumas pragas da agricultura, como as cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* Stal e *M. fimbriolata* Stal), as cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta* Stal e *Zulia enteriana* Berg.), os percevejos da soja (espécies dos gêneros *Nezara* e *Peizodorus*) e a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis* Fabricius) (Alves

¹ Trabalho a ser submetido para publicação: Tiago, P.V., Oliveira, N.T., Luna-Alves Lima, E.A. Aspecto morfológico e identificação molecular do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. *Arquivos do Instituto Biológico*.

et. al., 2008a). Sua patogenicidade também foi testada com resultados satisfatórios para formigas (*Atta sexdens sexdens* Linnaeus) (Loreiro & Monteiro, 2005), térmitas (*Nasutitermes coxipoensis* Holmgren, *Reticulitermes speratus* Kolbe) (Albuquerque et al., 2005), gafanhotos (*Melanoplus sanguinipes* Fabricius, *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn, *Schistocerca gregaria* Forskal e *Shistocerca pallens* Thunberg) (Xavier-Santos et al., 1999a; Magalhães et al., 2000; Entz et al., 2008; Tounou et al., 2008), entre outros insetos.

Vários estudos foram realizados, permitindo um conhecimento mais acurado sobre *M. anisopliae*. Esses estudos estão relacionados com as características morfológicas (microestruturas, forma e coloração da colônia) (Jabor et al., 2003; Macedo, 2005), bioquímicas (produção de enzimas e toxinas) (Amiri-Besheli et al., 2000; Tiago et al., 2002), genéticas (ciclo parassexual, fusão de protoplasto, transformação genética) (Valadares-Inglis & Azevedo, 1997; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Duarte et al., 2007) e moleculares (polimorfismo, estudo de genes específicos, filogenia) (Driver et al., 2000; Velásquez et al., 2007; Wang et al., 2008). A maioria desses trabalhos foi realizada utilizando isolados de *M. anisopliae* obtidos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas e tendo como objetivo final a obtenção de características que serão úteis no controle biológico de insetos.

A caracterização morfológica baseada na análise das microestruturas fúngicas é uma técnica que não deve ser desprezada (Luna-Alves Lima, 1989; Feijó et al., 2007; 2009; Vieira et al., 2009) e fundamental para o processo de reconhecimento da espécie e caracterização de isolados. No primeiro caso, a descrição das microestruturas poderá auxiliar no trabalho de identificação do fungo por pesquisadores e técnicos, principalmente, aqueles envolvidos no processo de produção massal de *M. anisopliae*, visto que poderá ocorrer contaminação por outros organismos que visualmente são semelhantes à espécie citada. No segundo caso, a caracterização de isolados possibilita verificar as variações entre os mesmos e obter informações peculiares para cada isolado. Esses estudos deverão ser auxiliados e confrontados com os estudos moleculares, utilizando iniciadores específicos que são imprescindíveis para uma adequada taxonomia ao nível de espécie e variedade.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar e analisar aspectos morfológicos de 37 isolados de *M. anisopliae* e identificá-los ao nível de variedade, utilizando iniciadores específicos.

Material e Métodos

Foram estudados 37 isolados de *M. anisopliae* obtidos de *M. fimbriolata*, com exceção dos isolados URM6106 e URM6112 que foram obtidos de amostras de solo no município de Tangará da Serra, Sudoeste de Mato Grosso, Brasil. O isolado URM6098 foi obtido de *M. fimbriolata*, no município de Aripuanã, Norte de Mato Grosso. Estes isolados foram depositados na Micoteca - URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Para a caracterização e análise das estruturas microscópicas foi empregada a técnica de cultura sob lamínula, na qual porções do material fúngico foram transferidas para pontos equidistantes da placa de Petri contendo BDA e sobre cada porção foram colocadas lamínulas, previamente esterilizadas. As estruturas microscópicas dos isolados foram analisadas as 48, 72, 96 e 120 horas de crescimento, as lamínulas foram retiradas do meio de cultura, colocadas invertidas sobre uma lâmina, coradas com azul de Amann e observadas ao microscópio óptico. A caracterização morfológica macroscópica foi baseada na forma e na coloração da colônia, para isso, uma porção da cultura fúngica foi transferida para o centro de uma placa de Petri contendo BDA e incubada à temperatura de 28°C por 15 dias.

Para a realização da identificação dos isolados ao nível de variedade, estes foram cultivados em Meio Mínimo líquido e mantidos sob agitação de 35 rpm a 28°C por 120 horas. Em seguida, o micélio foi coletado por filtração a vácuo e lavado com água destilada esterilizada. Foi determinado o peso úmido para a extração do DNA e estocado a 20°C. O DNA foi extraído pelo método de Kuramae-Isioka (1997). A Reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*) foi realizada utilizando os iniciadores ITSmet/ITS4, segundo Destéfano et al. (2004). Foi utilizado como grupo externo o isolado de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412.

Resultados e Discussão

A sequência de formação das estruturas variou para cada isolado estudado, mas de um modo geral, a partir da germinação dos conídios, foram observados: blastosporos, apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforo jovem, conidióforo ramificado e conídios cilíndricos (Quadro 1) peculiares de *M. anisopliae*.

Os isolados URM5952 e URM6133 apresentaram somente formação micelial as 48 horas de crescimento, diferindo dos demais que apresentaram outras microestruturas nessa fase de crescimento. Exceção foi verificada para o isolado URM6108, que não apresentou formação micelial após 48 horas da inoculação (Quadro 1).

Blastosporos foram observados as 48 e/ou as 72 horas de desenvolvimento, com exceção dos isolados URM6098, URM6101, URM6104, URM6105 e URM6132 que produziram estas estruturas após 48, 72 e 96 horas. Não foi observada a formação de blastosporos para os isolados URM5946, URM5949, URM5950, URM6099, URM6106 e URM6115. Essas estruturas foram observadas em várias espécies de fungos entomopatogênicos e são produzidas em cultura submersa (Kleespies & Zimmermann, 1998; Jackson & Jaronski, 2009) e na hemolinfa do inseto hospedeiro (Alves, 1998b). Estudos citológicos efetuados com *Beauveria bassiana*, em meios de cultura líquidos, indicaram que os blastosporos se originam a partir da germinação de conídios, nas primeiras 16 horas após inoculação, ou da diferenciação hifal, em cultura de mais de 72 horas (Luna-Alves Lima & Tigano, 1989).

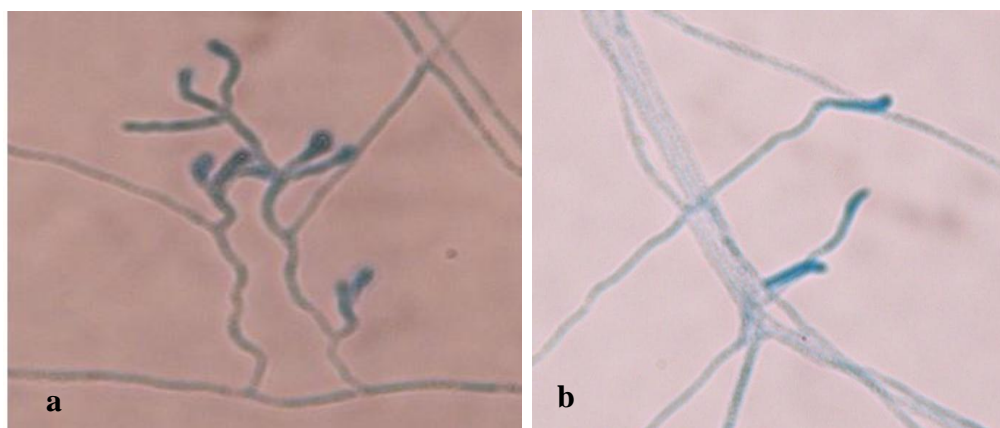


Figura 1 - Apressórios de *Metarhizium anisopliae*. a) isolado URM6110 120h (47,7x); b) isolado URM5946 48h (46x).

Todos os isolados produziram apressório (Figura 1) durante seu desenvolvimento, inclusive após 120 horas. Essa estrutura foi verificada após 72 horas para o isolado de *M. anisopliae* var. *anisopliae* PL₄₃ (Feijó et al., 2009) e após 48 horas de crescimento para o isolado de *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412 (Vieira et al., 2009). O apressório, formado na extremidade da hifa, pode estar envolvido no mecanismo de patogenicidade do fungo, tendo a função de iniciar o processo de penetração da epicutícula e procutícula do

tegumento do inseto (Alves, 1998b). Recentemente, foi relatada a participação de proteínas (piripilinas) na diferenciação dos apressórios em *M. anisopliae*, uma vez que a desativação do gene *Mpl1* em algumas linhagens gerou deficiência no processo de infecção (Wang & St. Leger, 2007b). Os apressórios ocorrem em *Metarhizium*, mas podem não se formar de modo característico em determinadas condições laboratoriais, visto que fatores nutricionais e ambientais interferem na sua formação (Xavier-Santos et al., 1999b).

Os isolados apresentaram primórdio de conidióforo e conidióforo simples a partir das 48 e/ou 72 horas, com exceção dos isolados URM5952, URM6105 e URM6110, que apresentaram estas estruturas a partir das 96 horas (Figura 2). Os isolados URM5949, URM6096, URM6131 e URM6132 apresentaram conidióforos jovens com 48 horas e os isolados URM5947 e URM6103 produziram conidióforos ramificados a partir de 72 horas de crescimento. Os demais isolados apresentaram conidióforo jovem e/ou conidióforo ramificado as 96 e 120 horas (Figura 3), com exceção dos isolados URM5950, URM6098, URM6106 e URM6112 que não apresentaram conidióforos jovens e ramificados nas condições estudadas. Vieira et al. (2009) verificaram conidióforos a partir de 48 horas para *M. anisopliae* var. *acridum*, enquanto Feijó et al. (2009) verificaram a partir de 96 horas para *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

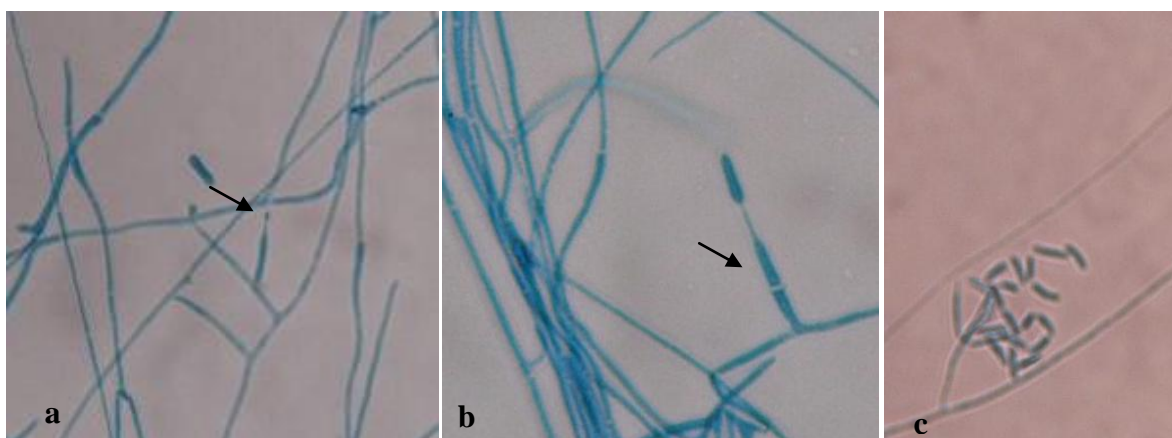


Figura 2 - Microestruturas de *Metarhizium anisopliae*. a) primórdio de conídio (seta), isolado URM6115 48h (47,7x); b) conidióforo simples (seta), isolado URM6115 48h (47,7x); c) conidióforo jovem, isolado URM6110 120h (46x).

Os conídios cilíndricos foram observados principalmente a partir das 72 horas de crescimento, com exceção dos isolados URM5947, URM5949 e URM6096 que apresentaram essas estruturas reprodutivas a partir das 48 horas. Os isolados URM5950,

URM6098 e URM6106 não apresentaram conídios nas condições estudadas. Vieira et al. (2009) verificaram produção de conídios a partir de 48 horas.

Foi observado, portanto, que o desenvolvimento das microestruturas ocorreu em tempos diferentes para cada isolado e, em alguns casos, microestruturas como os blastosporos não foram observados. Dos 37 isolados, somente seis desenvolveram estruturas reprodutivas com 48 horas, enquanto para a maioria foi observado o desenvolvimento destas estruturas a partir das 96 horas.

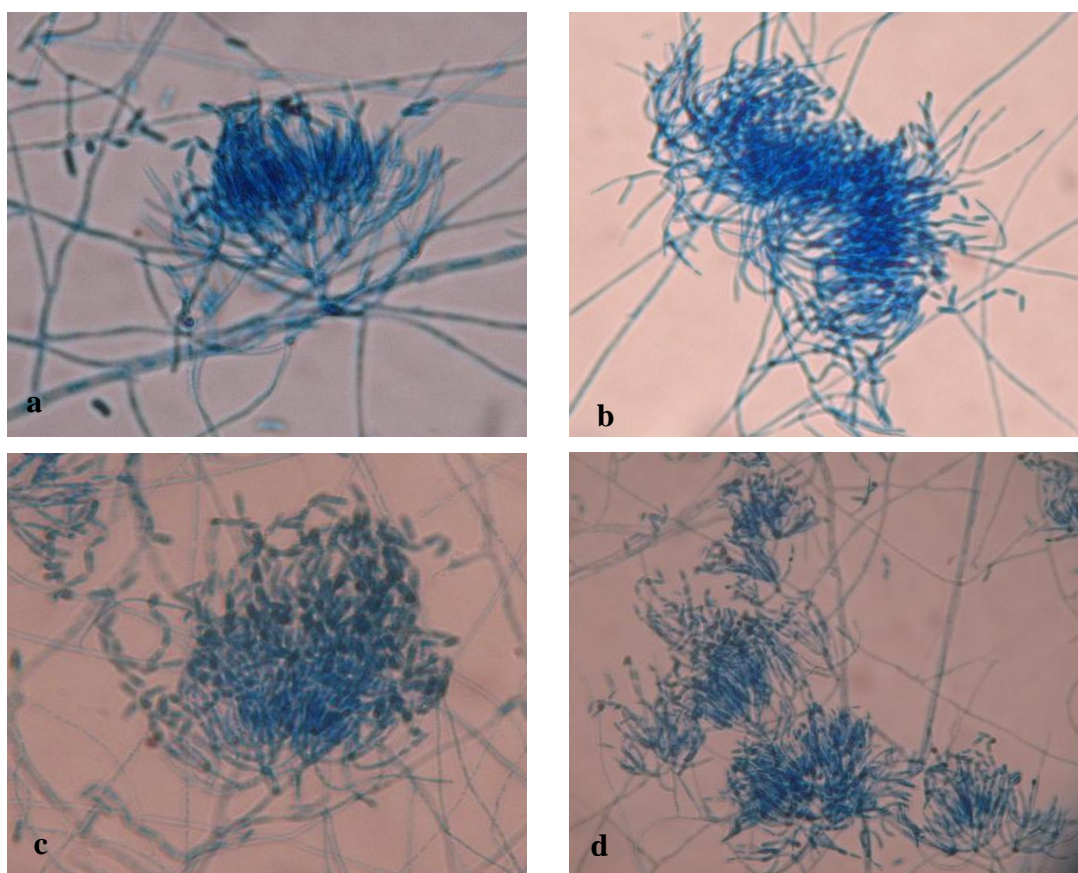


Figura 3 - Conidióforos ramificados e conídios cilíndricos de isolados de *Metarhizium anisopliae* com 120 h. a) isolado URM6113 (46x); b) isolado URM6112 (46x); c) isolado URM5947 (47,7x); d) isolado URM5947 (44,7x).

Foi evidenciada uma alta diversidade morfológica referente à textura e coloração das colônias que variou de amarelada a acinzentada ou verde oliva, e algumas colônias apresentaram crescimento micelial predominante (Figura 4). Características semelhantes foram observadas por Macedo (2005) quando estudou 20 isolados de *M. anisopliae*, após crescimento em Meio Completo (MC). A maioria dos isolados foi obtido das cigarrinhas,

M. fimbriolata e *M. posticata*.

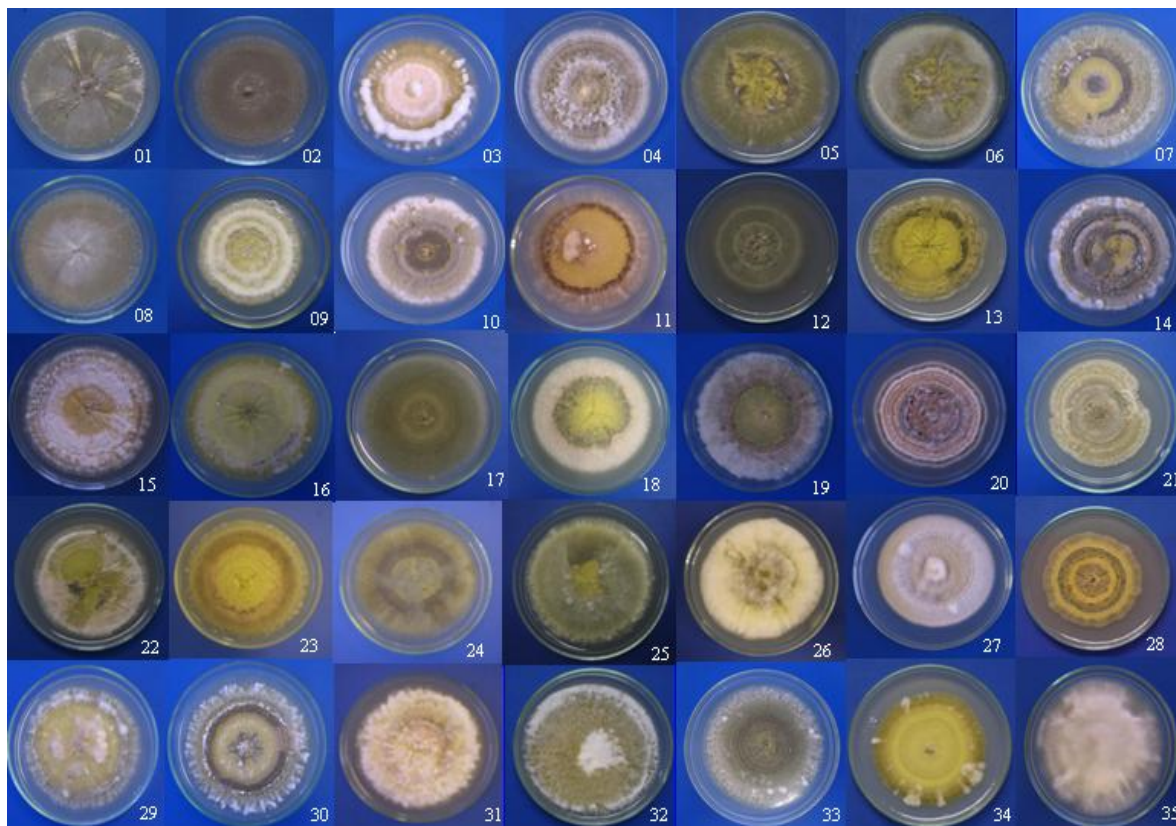


Figura 4 - Características morfológicas macroscópicas de isolados de *Metarhizium anisopliae* em meio BDA após 15 dias de incubação, originados de *Mahanarva fimbriolata*, no município de Tangará da Serra-MT. 01 – URM5946; 02 – URM5947; 03 – URM5948; 04 – URM5949; 05 – URM5950; 06 – URM5951; 07 – URM5952; 08 – URM6033; 09 – URM6034; 10 – URM6035; 11 – URM6096; 12 - URM6097; 13 - URM6098; 14 – URM6100; 15 – URM6101; 16 – URM6102; 17 – URM6103; 18 – URM6104; 19 – URM6105; 20 – URM6106; 21 - URM6107; 22 – URM6108; 23 – URM6109; 24 – URM6110; 25 – URM6111; 26 – URM6112; 27 – URM6113; 28 – URM6114; 29 – URM6128; 30 – URM6129; 31 – URM6130; 32 – URM6131; 33 – URM6132; 34 – URM6133; 35 – URM6210.

A amplificação com os iniciadores ITSmet/ITS4 confirmou que os isolados são *M. anisopliae* var. *anisopliae*, visto que ocorreu amplificação do DNA de todos os isolados obtidos de *M. fimbriolata*, gerando um fragmento de aproximadamente 450 pb, com exceção de *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412 (Figura 5). Segundo Destéfano et al. (2004) esta técnica poderá ser utilizada para a detecção de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, em estudos de laboratório e de campo.

A análise morfológica demonstrou a grande variabilidade intraespecífica e serviu de base para a diferenciação dos isolados e a técnica molecular utilizada mostrou-se eficiente

e permitiu uma rápida identificação dos isolados.



Figura 5 - Amplificação com o par de iniciadores ITSmet/ITS4, específicos para *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. M: marcador de peso molecular 100 pb. 1 – 37: isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae*; 38: *M. anisopliae* var. *acridum* URM 4412.

Quadro 1 - Microestruturas de isolados de *Metarhizium anisopliae* as 48, 72, 96 e 120 h de crescimento em meio BDA

Isolados	Tempo (h)			
	48	72	96	120
URM5946	Apressórios, primórdio de conidióforo	Apressórios, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, conidióforos ramificados, conídios cilíndricos
URM5947	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Conidióforos simples, jovem e ramificado, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos ramificados, conídios cilíndricos
URM5948	Blastosporos	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Apressórios	Apressórios, conidióforos ramificados, conídios cilíndricos
URM5949	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM5950	Apressórios, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo
URM5951	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM5952	Formação micelial	Blastosporos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos

Continua...

...Continuação

URM6033	Apressórios, blastosporos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos jovem, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos ramificados, conídios cilíndricos
URM6034	Apressórios, blastosporos	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos
URM6035	Blastosporos, primórdio de conidióforo	Blastosporos, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo e conidióforos jovem	Apressórios, Conidióforos jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6096	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6097	Blastosporos, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos simples e ramificados, conídios cilíndricos
URM6098	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo	Blastosporos, conidióforos simples	Blastosporos, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo
URM6099	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6100	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6101	Blastosporos	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6102	Apressórios, blastosporos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6103	Blastosporos	Apressórios, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos simples e jovem	Apressórios, conidióforos jovem e ramificados, conídios cilíndricos

Continua...

...Continuação

URM6104	Blastosporos	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6105	Blastosporos	Apressórios, blastosporos	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos jovem	Apressórios, conidióforos simples e ramificados, conídios cilíndricos
URM6106	Apressórios, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo
URM6107	Blastosporos	Blastosporos, primórdio de conidióforo	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6108	Não foi observado formação micelial	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos
URM6109	Blastosporos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6110	Blastosporos	Blastosporos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6111	Blastosporos, primórdio de conidióforo	Blastosporos, primórdio de conidióforo	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6112	Apressórios, blastosporos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos
URM6113	Blastosporos	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e ramificados, conídios cilíndricos
URM6114	Blastosporos	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos

Continua...

...Continuação

URM6115	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos simples e ramificados, conídios cilíndricos
URM6128	Apressórios, blastosporos	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6129	Apressórios, blastosporos	Apressórios, conidióforos simples e jovem, conídios cilíndricos	Conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6130	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Blastosporos, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6131	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Primórdio de conidióforo, conidióforos simples e ramificados, conídios cilíndricos
URM6132	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e jovem	Apressórios, blastosporos, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6133	Formação micelial	Blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, jovem e ramificados, conídios cilíndricos
URM6210	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples	Apressórios, blastosporos, primórdio de conidióforo, conidióforos simples, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e ramificados, conídios cilíndricos	Apressórios, primórdio de conidióforo, conidióforos simples e ramificados, conídios cilíndricos

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Existe alta variabilidade morfológica e baixa variabilidade genética entre isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de mesma origem geográfica e mesmo hospedeiro;
- A amplificação da região ISSR pelos iniciadores (GACA)₄ e (GTG)₅ gera um padrão de fragmentos que permite a discriminação intraespecífica dos isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, mostrando-se eficientes como marcadores moleculares de rotina no monitoramento de campo;
- Baseada na curva de mortalidade confirmada, URM5946, URM5951 e URM6033 são considerados promissores para serem utilizados no controle de *M. fimbriolata*;
- URM5951 permanece viável no solo aos 60 dias do experimento e não interfere na comunidade fúngica do solo em que foi introduzido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W.S. 1925. A Method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- Albuquerque, A.C., Pereira, K.C.A., Cunha, F.M., Veiga, A.F.S.L., Athayde, A.C.R., Luna-Alves Lima, E.A. 2005. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). *Neotropical Entomology* 34: 585-591.
- Alexandre, T.M., Alves, L.F.A., Neves, P.M.O.J., Alves, S.B. 2006. Efeito da temperatura e cama do aviário na virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para o controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology* 35: 75-82.
- Almeida, J.E.M. 2003. Resultados do controle biológico da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar com *Metarhizium anisopliae*. In: *Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico*, 9. Catanduva. *Anais...* Catanduva: Instituto Biológico, 2003. p. 97.
- Almeida, J.E.M., Batista Filho, A., Santos, A.S. 2003. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hom., Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. *Arquivos do Instituto Biológico* 70: 101-103.
- Altieri, M. 2002. *Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável*. Guaíba, Agropecuária.
- Alves, S.B., Lopes, R.B., Vieira, S.A., Tamai, M.A. 2008a. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Alves, S.B., Lopes, R.B. (eds.). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Piracicaba: FEALQ, pp. 69-110.
- Alves, S.B., Leite, L.G., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Marques, E.J. 2008b. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: Alves, S.B., Lopes, R.B. (eds.). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Piracicaba: FEALQ, pp. 215-237.
- Alves, S.B. 1998a. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: Alves, S.B. (ed.). *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ, pp. 21-37.
- Alves, S.B. 1998b. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (ed.) *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ, pp. 289-381.
- Amari-Besheli, B., Khambay, B., Cameron, S., Deadman, M.L., Butt, T.M. 2000. Inter - and intra - specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp.,

- and its significance to pathogenesis. *Mycological Research* 104: 447-452.
- Anand, R., Prasad, B., Tiwary, B.N. 2009. Relative susceptibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi. *BioControl* 54: 85-92.
- Andaló, V., Moino Júnior, A., Santa-Cecília, L.V.C., Souza, G.C. 2004. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). *Arquivos do Instituto Biológico* 71: 181-187.
- Aquino de Muro, M., Elliott, S., Moore, D., Parker, B.L., Skinner, M., Reid, W., El Bouhssini, M. 2005. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of sunn pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). *Mycological Research* 109: 294-306.
- Aquino de Muro, M., Mehta, S., Moore, D. 2003. 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* 229: 249-257.
- Araujo Jr., J.M., Marques, E.J., Oliveira, J.V. 2009. Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do óleo de nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). *Neotropical Entomology* 38: 520-525.
- Assigbetse, K., Gueye, M., Thioulouse, J., Duponnois, R. 2005. Soil bacterial diversity responses to root colonization by an ectomycorrhizal fungus are not root-growth-dependent. *Microbial Ecology* 50: 350-359.
- Bagga, S., Hu, G., Screen, S.E., St. Leger, R.J. 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 324: 159-169.
- Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Santos, A.S. Machado, L.A., Alves, S.B. 2003. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). *Arquivos do Instituto Biológico* 70: 309-314.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101: 512-530.
- Boldo, J.T., Junges, A., Amaral, K.B., Staats, C.C., Vainstein, M.H., Schrank, A. 2009. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics* 55: 551-560.
- Bridge, P.D., Williams, M.A.J., Prior, C., Paterson, R.R.M. 1993. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Journal of General Microbiology* 139: 1163-1169.
- Bruck, D.J. 2005. Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: implications for pest management. *Biological Control* 32: 155-163.
- Carneiro-Leão, M.P. 2006. *Caracterização molecular (PCR) e infecção de Metarhizium*

- anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em *Zaprionus induanus*. 72f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos), Universidade Federal de Pernambuco.
- Chul, K.S, Goo, B.Y., Gyu, L.D., Heon, K.Y. 1996. Antifungal activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria solani*. *Korean Journal of Mycology* 24: 49-55.
- Coates, B.S., Hellmich, R.L., Lewis, L.C. 2002. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. *Mycological Research* 106: 40-50.
- Correa, G.S., Azevedo, J.L. 1986. Efeito do solo na germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *O solo* 78: 39-41.
- Correa, O.S., Montecchia, M.S., Berti, M.F., Ferrari, M.C.F., Pucheu, N.L., Kerber, N.L., García, A.F. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 41: 185-194.
- Destéfano, R.H.R., Destéfano, S.A.L., Messias, C.L. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Genetics and Molecular Biology* 27: 245-252.
- Dinardo-Miranda, L.L., Pivetta, J.P., Fracasso, J.V. 2008. Economic injury level for sugarcane caused by the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae). *Scientia Agricola* 65: 16-24.
- Dinardo-Miranda, L.L., Pivetta, J.P., Fracasso, J.V. 2006. Eficiência de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) e seus efeitos sobre a qualidade e produtividade da cana-de-açúcar. *BioAssay* 1: 1-7.
- Dinardo-Miranda, L.L., Vasconcelos, A.C.M., Ferreira, J.M.G., Garcia Jr., C.A., Coelho, A.L., Gil, M.A. 2004. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. *Neotropical Entomology* 33: 743-749.
- Dinardo-Miranda, L.L, Figueiredo, P., Landell, M.G.A., Ferreira, J.M.G., Carvalho, P.A.M. 1999. Danos causados pelas cigarrinhas das raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. *Stab-Açúcar, Álcool e Subprodutos* 17: 48-52.
- Dong, C., Zhang, J., Chen, W., Huang, H., Hu, Y. 2007. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*Metarhizium anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenic analysis. *Microbiological Research* 162: 53-61.
- Driver, F., Milner, R.J., Trueman, J.W.H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 104: 134-150.

- Duan, Z., Shang, Y., Gao, G., Zheng, P., Wang, C. 2009. A phosphoketolase Mpk1 of bacterial origin is adaptively required for full virulence in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Environmental Microbiology* 11: 2351-2360.
- Duarte, R.T.D., Staats, C.C., Fungaro, M.H., Schrank, A., Vainsten, M.H., Furlaneto-Maia, L., Nakamura, C.V., de Souza, W., Furlaneto, M.C. 2007. Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Letters in Applied Microbiology* 44: 248-254.
- Dutra, V., Nakazato, L., Broetto, L., Schrank, I.S., Vainstein, M.H., Schrank, A. 2004. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology* 155: 245-251.
- Entz, S.C., Kawchuk, L.M., Johnson, D.L. 2008. Discovery of a North American genetic variant of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* pathogenic to grasshoppers. *BioControl* 53: 327-339.
- Entz, S.C., Johnson, D.L., Kawchuk, L.M. 2005. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycological Research* 109: 1302-1312.
- Estrada, M.E., Camacho, M.V., Benito, C. 2007. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using inter-microsatellites (ISSRs). *Cellular & Molecular Biology Letters* 12: 240-252.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Faleiro, F.G. 2007. *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina, Embrapa Cerrados.
- Fang, W., Pava-ripoll, M., Wang, S., St. Leger, R. 2009. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 277-285.
- Fang, W., Pei, Y., Bidochka, M.J. 2007. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology* 153: 1017-1025.
- Faria, M.R., Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237-256.
- Faria, M.R., Magalhães, B.P. 2001. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 22: 18-21.
- Feijó, F.M.C., Lima, P.M., Melo, E.H.M., Athayde, A.C.R., Luna-Alves Lima, E.A. 2009. Behavior and cytological aspects of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride*

- after passage in *Chrysomya albiceps*. *Revista Caatinga* 22: 39-44.
- Feijó, F.M.C., Lima, P.M., Alves, N.D., Luna-Alves Lima, E.A. 2007. Comportamento e aspectos citológicos de *Beauveria bassiana* após passagem em ovo, larva e adulto de *Crhysomya albiceps*. *Arquivos do Instituto Biológico* 74: 349-355.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Embrapa-Cenargen.
- França, I.W.B., Marques, E.J., Torres, J.B., Oliveira, J.V. 2006. Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology* 35: 349-356.
- Freed, S., Jin, F.L., Ren, S.X. 2010. Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from different geographical origins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 359-370.
- Fungaro, M.H.P. 2000. PCR na Micologia. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 14: 12-16.
- Gaitan, A., Valderrama, A.M., Saldarriaga, G. 2002. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. *Mycological Research* 106: 1307-1314.
- Gliessman, S.R. 2001. *Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável*. Porto Alegre: UFRGS.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA- based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5488 – 5491.
- Guerra, D.M.S.; Pires, A.N.D.; Luna-Alves Lima, E.A. 2009. Persistência de *Metarhizium anisopliae* spp no solo sob diferentes condições de temperatura e umidade. *Revista Caatinga* 22: 18-22.
- Haugen, P., Simon, D.M., Bhattacharya, D. 2005. The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* 21: 111-119.
- Hegedus, D.D., Khachatourians, G.G. 1996. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 289-299.
- Herschkovitz Y., Lerner, A., Davidov, Y., Rothballer, M., Hartmann, A., Okon, Y., Jurkevitch, E. 2005a. Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* 50: 277-288.

- Herschkovitz Y., Lerner, A., Davidov, Y., Okon, Y., Jurkevitch, E. 2005b. *Azospirillum brasilense* does not affect population structure of specific rhizobacterial communities of inoculated maize (*Zea mays*). *Environmental Microbiology* 7: 1847-1852.
- Hu, G., St. Leger, R.J. 2002. Field studies of a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied Environmental Microbiology* 68: 6383-6387.
- Ihara, F., Yaginuma, K., Kobayashi, N., Mishiro, K., Sato, T. 2001. Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* 36: 495-500.
- Inglis, G.D., Duke, G.M., Goettel, M.S., Kabaluk, J.T. (2008). Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 101-113.
- Jabor, I.A.S., Pamphile, J.A., Rodrigues, S.B., Marques-Silva, G.G., Rocha, C.L.M.S.C. 2003. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. *Acta Scientiarum Agronomy* 25: 497-501.
- Jackson, M.A., Jaronski, S.T. 2009. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research* 113: 842- 850.
- Jaramillo, J., Borgemeister, C. 2006. New bioassay method to assess the pathogenicity of Colombian strains of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Paecilomyces* sp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 57-60.
- Jensen, A.B., Thomsen, L., Eilenberg, J. 2001. Intraspecific variation and host specificity of *Entomophthora muscae* sensu stricto isolates revealed by random amplified polymorphic DNA, universal primed PCR, PCR-restriction fragment length polymorphism, and conidial morphology. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 251-259.
- Kleespies, R.G., Zimmermann, G. 1998. Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 8: 207-214.
- Kuklinsky-Sobral, J., Luna-Alves Lima, E.A., Araújo, J.M., Azevedo, J.L. 2004. Genetic variability in regenerated *Metarhizium flavoviride* protoplasts. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47: 1-6.
- Kuramae-Isioka, E.E. 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Unimar* 19: 683-689.
- Lanza, L.M., Monteiro, A.C., Malheiros, E.B. 2004. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. *Ciência Rural* 34: 1757-1762.

- Leite, L.G., Alves, S.B., Takada, H.M., Batista Filho, A., Roberts, D.W. 2002. Occurrence of Entomophthorales on spittlebugs pests of pasture in eastern São Paulo state, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico* 69: 63-68.
- Lihme, M., Jensen, A.B., Rosendahl, S. 2009. Local scale population genetic structure of *Entomophthora muscae* epidemics. *Fungal Ecology* 2: 81-86.
- Lima, M.L.F. 2005. *Caracterização molecular e patogênica de Metarhizium spp. sobre Diatraea saccharalis*. 88f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos), Universidade Federal de Pernambuco.
- Liu, Z.Y., Liang, Z.Q., Whalley, A.J.S., Yao, Y.J., Liu, A.Y. 2001. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 178-182.
- Loureiro, E.S., Moino Jr., A. 2006. Patogenicidade de fungos hifomicetos aos pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Neotropical Entomology* 35: 660-665.
- Loureiro, E.S., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Pessoa, L.G.A. 2005. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. *Neotropical Entomology* 34: 791-798.
- Loureiro, E.S., Monteiro, A.C. 2005. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore* 29: 553- 561.
- Loureiro, E.S. 2004. *Seleção e avaliação de campo de isolados de Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin para o controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, Mahanarva fimbriolata (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae)*. 91f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Proteção de plantas), Universidade Estadual de São Paulo.
- Luna-Alves Lima, E.A. 1989. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84: 17-20.
- Luna-Alves Lima, E.A., Tigano, M.S. 1989. Citologia das estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de cultura líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*. *Revista de Microbiologia* 20: 85-94.
- Macedo, D., Alves, S.B., Vieira, S.A. 2006. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. a *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). *Semina* 27: 47-52.
- Macedo, D. 2005. *Seleção e caracterização de Metarhizium anisopliae visando ao controle de Mahanarva fimbriolata (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar*. 87f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências: Entomologia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- Magalhães, B.P., Lecoq, M., Faria, M.R., Schmidt, F.G.V., Guerra, W.D. 2000. Field trial with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* against bands of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. *Biocontrol Science and Technology* 10: 427-441.
- Malosso, E., Waite, I.S., Hopkins, L.E.D.W., O'Donnell, A.G. (2006). Fungal diversity in maritime Antarctic soils determined using a combination of culture isolation, molecular fingerprinting and cloning techniques. *Polar Biology* 29: 552-561.
- Margarido, L.A.C., Ruas, D.G.G., Lavorenti, N.A., Matsuoka, S., Beskow, P.R., Stolf, R. 2005. Produção orgânica da cana-de-açúcar, açúcar mascavo, melaço e rapadura: uma experiência. *Revista Extensão Rural e Desenvolvimento Sustentável* 1: 1-5.
- Marques, E.J., Villas Boas, A.M., Pereira, C.E.F. 1981. Orientações técnicas para a produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em laboratórios setoriais. *Boletim Técnico Planalsucar* 3: 5-23.
- Marques, E.K., Ikuta, N., Lunge, V. R., Fonseca, A.S.K. 2002. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: Serafini, L.A., Barros, N.M., Azevedo, J.L. (orgs). *Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria*. Caxias do Sul, EDUCS, pp. 103-129.
- Márquez, M., Iturriaga, E.A., Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., Monte, E., Hermosa, R. 2006. Detection of potentially valuable polymorphisms in four group I intron insertion sites at the 3'-end of the LSU rDNA genes in biocontrol isolates of *Metarhizium anisopliae*. *BMC Microbiology* 6: 1-8.
- Marschner, P., Crowley, D.E., Lieberei, R. 2001. Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. *Mycorrhiza* 11: 297-302.
- Martins, J.F.S., Botton, M, Carbonari, J.J., Quintela, E.D. 2004. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. *Ciência Rural* 34: 1681-1688.
- Matioli, S.R., Passos-Bueno, M.R.S. 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: Matioli, S.R. (ed). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, pp. 153-161.
- Mavridou, A., Cannone, J., Typas, M.A. 2000. Identification of group-I introns at three different positions within the 28S rDNA gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology* 31: 79-90.
- Mavridou, A., Typas, M.A. 1998. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. *Mycological Research* 102: 1233-1241.
- Mccoy, C.W., Milani-Tigano, M.S. 1996. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 27: 87-93.

- Mendonça, A.F, Mendonça, I.C.B.R. 2005. Cigarrinha-da-raiz *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). In: Mendonça, A.F. (ed.). *Cigarrinha da cana-de-açúcar: controle biológico*. Maceió: Insecta, pp. 95-140.
- Mendonça, A.F. 1996. Introdução da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal), no estado de Alagoas, Brasil: Importância econômica e controle. In: Mendonça, A.F. (ed.). *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió: Insetos & Cia, pp. 193-207.
- Mendonça, A.F, Barbosa, G.V.S., Marques, E.J. 1996. As cigarrinhas da cana-de-açúcar (Hemiptera: Cercopidae) no Brasil. In: Mendonça, A.F. (ed.). *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió: Insetos & Cia, pp. 169-192.
- Meyling, N.V., Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control* 43: 145-155.
- Michereff Filho, M, Faria, M., Wraight, S.P., Silva, K.F.A.S. 2009. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? *Arquivos do Instituto Biológico* 76: 769-779.
- Monteiro, R.T.R., Frighetto, R.T.S. 2000. Determinação da umidade, pH e capacidade de retenção de água do solo. In: Frighetto, R.T.S., Valarini, P.J. (Coords.). *Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo: manual técnico*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. 198p. (Embrapa Meio Ambiente. Documento, 21).
- Neuvéglise, C., Brygoo, Y., Riba, G. 1997. 28s rDNA group-I introns: a powerful tool for identifying strains *Beauveria brongniartii*. *Molecular Ecology* 6: 373-381.
- Neuvéglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B., Riba, G. 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycological Research* 98: 322-328.
- Nicholls, C.I., Altieri, M.A. 2007. Projeção e implantação de uma estratégia de manejo de habitats para melhorar o controle biológico de pragas em Agroecossistemas. In: Nicholls, C. I., Altieri, M.A., Luigi, P. *Controle biológico de pragas através do manejo de agroecossistemas*. Brasília, MDA, pp. 2-16.
- Nodari, R.O. 1999. A promiscuidade dos introns. *Ciência Hoje* 147.
- Oliveira, M.A.S., Alves, R.T., Fialho, J.F., Junqueira, N.T.V. 2001. Patogenicidade de fungos entomógenos sobre o percevejo-de-renda da mandioca no Distrito Federal. *Comunicado Técnico*. Embrapa Cerrados, Planaltina, n. 45, p.1-4.
- Oliveira, M.G., Oliveira, N.T., Luna-Alves Lima, E.A. 1997. Novos biótipos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin com germinação alterada de conídios, obtidos pela exposição à radiação gama. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 40: 586-595.
- Peixoto, M.F., Fernandes, P.M., Soares, R.A.B., Barbosa, R.V., Oliveira, R.R.C. 2009. Controle e perdas provocadas por *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae)

em cana de açúcar. *Global Science and Technology* 2: 114-122.

- Pipe, N. D., Chandler, D., Bainbridge, B.W., Heale, J.B. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 99: 485-491.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Chemmons, L.M., MacDonald, K.D., Bufton, A.W.J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5: 141-238.
- Pria Júnior, W.D., Lacava, P.T., Messias, C.L., Azevedo, J.L., Lacava, P.M. 2008. Bioassay assessment of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Deuteromycota: Hyphomycetes) against *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae). *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 128-132.
- Rehner, S.A. 2005. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria* In: Vega, F.E., Blackwell, M. (eds.) *Insect-Fungal Associations, Ecology and Evolution*. Oxford Univ. Press, New York, pp. 3-27.
- Reid, W.R., Parker, B.L., Gouli, S.Y., Skinner, M., Gouli, V.V., Teillon, H.B. 2010. Fungi associated with the hemlock woolly adelgid, *Adelges tsugae*, and assessment of entomopathogenic isolates for management. *Journal of Insect Science* 10: 62.
- Roesti, D., Gaur, R., Johri, B.N., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K., Aragno, M. 2006. Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1111-1120.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Manual. *Applied Biostatistics*. Inc. New York.
- Rossi-Zalaf, L.S., Alves, S.B., Lopes, R.B., Neto, S.S., Tanzini, M.R. 2008. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: Alves, S.B., Lopes, R.B. (eds.). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Piracicaba: FEALQ, pp. 279-302.
- Samuels, R.I., Coracini, D.L.A. 2004. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for the control of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae). *Scientia Agricola* 61: 271-275.
- Samuels, R.I., Coracini, D.L.A., Martins dos Santos, C.A., Gava, C.A.T. 2002. Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biological Control* 23: 269-273.
- Schwarzenbach, K., Enkerli, J., Widmer, F. 2009. Effects of biological and chemical insect control agent on fungal community structures in soil microcosms. *Applied Soil Ecology* 42: 54-62.
- Shimizu, S., Yamaji, M. 2003. Effect of density of the termite, *Reticulitermes speratus* Kolbe (Isoptera: Rhinotermitidae), on the susceptibilities to *Metarhizium anisopliae*. *Applied*

Entomology and Zoology 38: 125-130.

- Silva, F.A.S.; Azevedo, C.A.V. Principal Components Analysis in the software Assistat - Statistical Assistance. In: *World Congress on Computers in Agriculture*, 7, Reno-NV-USA. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- Staats, C.C. 2007. *Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico Metarhizium anisopliae*. 127f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- St. Leger, R.J. 2008. Studies in adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 271-276.
- St. Leger, R.J., Goettel, M., Roberts, D.W., Staples, R.C. 1991. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 168-179.
- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B., Spatafora, J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5-59.
- Takatsuka, J. 2007. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Applied Entomology and Zoology* 42: 563-571.
- Thomas, S.R., Elkinton, J.S. 2004. Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 146-151.
- Tiago, P.V., Fungaro, M.H.P., Furlaneto, M.C. 2002. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. *Letters in Applied Microbiology* 34: 91-94.
- Tounou, A.K., Kooyman, C., Douro-Kpindou, O.K., Poehling, H.M. 2008. Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 203-210.
- Tymon, A.M., Pell, J.K. 2005. ISSR, ERIC and RAPD techniques to detect genetic diversity in the aphid pathogen *Pandora neoaphidis*. *Mycological Research* 109: 285-293.
- Vainio, E.J., Hantula, J. 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research* 104: 927-936.
- Valadares-Inglis, M.C., Azevedo, J.L. 1997. Amylase and protease secretion in recombinant strains of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* following parasexual crosses. *Brazilian Journal of Genetics* 20: 171-175.
- Velásquez, V.B., Cárcamo, M.P., Meriño, C.R., Iglesias, A.F., Durán, J.F. 2007. Intraspecific

- differentiation of chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetics and Molecular Biology* 30: 89-99.
- Vieira, P.D.S., Silva, W.M.T., Paiva, L.M., Luna-Alves Lima, E.A., Cavalcanti, E.A. 2009. Estudo da caracterização morfológica, esporulação e germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em diferentes temperaturas. *O Biológico* 71: 43-47.
- Wada, S., Horita, M., Hirayae, K., Shimazu, M. 2003. Discrimination of Japanese isolates of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) by RFLP of the rDNA-ITS regions. *Applied Entomology and Zoology* 38: 551-557.
- Wamberg, C., Christensen, S., Jakobsen, I., Müller, A.K., Sørensen, S.J. 2003. The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biology & Biochemistry* 35: 1349-1357.
- Wang, C., Duan, Z., St. Leger, R.J. 2008. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell* 7: 302-309.
- Wang, C., St. Leger, R.J. 2007a. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* 6: 808-816.
- Wang, C., St. Leger, R.J. 2007b. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure and virulence. *Journal of Biological Chemistry* 282: 21110-21115.
- Wang, C., St. Leger, R.J. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 6647-6652.
- Wang, C., Hu, G., St. Leger, R.J. 2005. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology* 42: 704-718.
- Wang, C., Li, Z., Typas, M.A., Butt, T.M. 2003. Nuclear large subunit rDNA group I intron distribution in a population of *Beauveria bassiana* strains: phylogenetic implications. *Mycological Research* 107: 1189-1200.
- Wang, G.H., Jin, J., Xu, M.N., Pan, X.W., Tang, C. 2007. Inoculation with phosphate-solubilizing fungi diversifies the bacterial community in rhizospheres of maize and soybean. *Pedosphere* 17: 191-199.
- Wang, S., Miao, X., Zhao, W., Huang, B., Fan, M., Li, Z., Huang, Y. 2005. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycological Research* 109: 1364-1372.

- Xavier, G.R., Zilli, J.E., Rumjanek, N.G. 2004. *Estudo da comunidade microbiana do solo através de clonagem, eletroforese em géis desnaturantes (DGGE/TGGE) e conformação de fita simples do DNA (SSCP)*. Soropédica: Embrapa Agrobiologia. 28p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 172).
- Xavier, L.M.S., Ávila, C.J. 2006. Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin e de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin a *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 50: 540-546.
- Xavier-Santos, S., Magalhães, B.P., Luna-Alves Lima, E.A. 1999a. Infectivity of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in the laboratory. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28: 359-363.
- Xavier-Santos, S., Magalhães, B.P., Luna-Alves Lima, E.A. 1999b. Differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycetes). *Revista de Microbiologia* 30: 47-51.
- Zar, J.H. 2009. *Biostatistical Analysis*. 5th edition. London: Prentice Hall Press.
- Zhang, B., Bai, Z., Hoefel, D., Tang, L., Yang, Z., Zhuang, G., Yang, J., Zhang, H. 2008. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere. *FEMS Microbiology Letters* 284: 102-108.