



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS NATURAIS**

**OCORRÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLOS
NATURAL E CULTIVADO**

ANA GORETE CAMPOS DE AZEVEDO

**SÃO CRISTOVÃO
2013**

ANA GORETE CAMPOS DE AZEVEDO

**OCORRÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLOS NATURAL E
CULTIVADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais na área de concentração de Biotecnologia de Recursos Naturais

Orientador Profº. Drº. Marcelo da Costa Mendonça

Co-orientadora Profª. Drª. Renata Silva Mann

SÃO CRISTOVÃO
SERGIPE - BRASIL
2013

ANA GORETE CAMPOS DE AZEVEDO

**OCORRÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLOS NATURAL E
CULTIVADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais na área de concentração de Biotecnologia de Recursos Naturais

Aprovado em 28 de fevereiro de 2013 na Embrapa Tabuleiros Costeiros

Profº Drº. Leandro Eugenio Cardemone Diniz - Embrapa Tabuleiros Costeiros

Drº. Adenir Vieira Teodoro – Embrapa Tabuleiros Costeiros

Profº. Drº. Marcelo da Costa Mendonça - UFS
(Orientador)

SÃO CRISTOVÃO
SERGIPE - BRASIL
2013

A minha querida mãe Rosa Maria, dedicó.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcelo da Costa Mendonça, pela grande contribuição na minha formação acadêmica, pela orientação, pela paciência e confiança durante todos esses anos;

À Drª. Renata Mann, pela coorientação e apoio;

Ao Dr. Leandro Diniz pela grande ajuda e contribuição;

Ao Dr. Adenir Teodoro pela disponibilidade e por aceitar fazer parte da banca examinadora;

A todos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Tabuleiros Costeiros, pela grande ajuda, companheirismo e afeto, em especial, ao técnico Chico, a Lourdes, a Raimundo e a Drª Joana, e também aos meus queridos, Dani, Gabi, Aline e Samuel;

A todos do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em especial, ao técnico Silvio e a Rita;

Aos demais pesquisadores e funcionários da Embrapa Tabuleiros Costeiros,

A todos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Esalq, pelo acolhimento e valiosa ajuda, em especial, ao Dr. Ítalo Delalibera e à bióloga Solange Barros;

A Luciano Roberto pelo imenso apoio nas coletas de campo, pelo incentivo e dedicação.

À Universidade Federal de Sergipe e ao Núcleo de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais;

Aos professores e colegas do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais;

Ao Instituto Tecnológico e de Pesquisa do Estado de Sergipe pelo apoio nas análises do solo;

À CAPES, pelo apoio financeiro.

*In his omnibus super vincimus per eum,
qui dilexit nos.*

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
2. Referencial Teórico	2
2.1. Biodiversidade de fungos entomopatogênicos	2
2.2. Fatores que afetam os fungos entomopatogênicos no solo	3
2.3. Caracterização de fungos entomopatogênicos	5
Capítulo I: Fatores que afetam a ocorrência de fungos entomopatogênicos em solos natural e cultivado	7
Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Materiais e Métodos	11
1. Caracterização das áreas de coleta e amostragem do solo	11
2. Isolamento de fungos entomopatogênicos do solo	13
2.1. Método de suspensão do solo e meio de cultura seletivo	13
2.2. Método inseto-isca	14
3. Identificação, purificação e conservação dos isolados	15
4. Análise dos dados	16
Resultados e Discussão	16
Conclusões.....	20
Referências	21
Capítulo II: Variabilidade genética de fungos entomopatogênicos isolados em habitat natural e cultivado	25
Resumo	26
Abstract	27
Introdução	27
Materiais e Métodos	28
Resultados e Discussão	31
Conclusões	36
Referências	37
3. Conclusões Gerais	40
4. Referências Gerais	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização dos pontos de amostragem de solo em três mesorregiões do estado de Sergipe	11
Figura 2. Efeito dos fatores de solo (pH, matéria orgânica e argila) e das características do local da amostragem do solo (mesorregião, período e habitat) na ocorrência de fungos entomopatogênicos em Sergipe	16
Figura 1. Dendograma de similaridades entre 19 acessos de <i>Beauveria</i> spp., para análise de RAPD, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard	32
Figura 2. Dendrograma de similaridades entre 13 acessos de <i>Metarhizium</i> spp., para análise de RAPD, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média da precipitação observada nas três mesorregiões de Sergipe relativa ao período seco e úmido de 2012	10
Tabela 2. Teste do Qui-Quadrado para os efeitos dos componentes variáveis do solo e das características dos locais de amostragem do solo na ocorrência dos fungos entomopatogênicos em Sergipe	15
Tabela 1. Relação de isolados dos gêneros <i>Beauveria</i> spp. e <i>Metarhizium</i> spp. de acordo com a região, período e habitat	28
Tabela 2. Relação dos primers utilizados no RAPD e avaliados para <i>Beauveria</i> e <i>Metarhizium</i>	29
Tabela 3. Iniciador, número de fragmentos polimóficos (NFPB e NFPM) e o número total de fragmentos (NTFB e NTFM),para <i>Beauveria</i> e <i>Metarhizium</i> , respectivamente	30

OCORRÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLOS NATURAL E CULTIVADO

RESUMO - Esse estudo objetivou avaliar a ocorrência e diversidade de fungos entomopatogênicos em Sergipe, considerando os fatores que afetam a sua distribuição. A análise foi realizada através de amostras de solos obtidas nas três mesorregiões que dividem o estado, em dois períodos de coleta, compreendendo uma estação seca e uma úmida, e em dois diferentes habitats (agrícola e natural). Parâmetros como pH, matéria orgânica e argila do solo foram considerados nas análises. Para o isolamento do fungo do solo foram utilizados dois métodos, solução de solo em meio de cultura seletivo e inseto-isca. Em um total de 48 amostras de solo, 41,7% foram consideradas positivas quanto a presença de fungos entomopatogênicos. Os fungos isolados foram pertencentes aos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*, da ordem Hypocreales. Verificou-se que os fatores referentes ao local de amostragem do solo (região, período e habitat) não mostraram diferenças significantes quanto as suas variáveis em relação à presença de fungos entomopatogênicos, diferente dos fatores do solo (pH, quantidade de matéria orgânica e argila) que mostraram significância. Os isolados foram submetidos a uma análise da variabilidade genética através da técnica molecular RAPD, foram selecionados 15 primers que produziram um total de 179 bandas (*Beauveria*) e 131 bandas (*Metarhizium*) e foram construídas matrizes de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard, que geraram dendrogramas através do método de agrupamento UPGMA, para cada fungo. Observou-se baixa similaridade genética entre os isolados de ambos os gêneros. Nesse trabalho, isolou-se fungos entomopatogênicos que podem ser úteis para o controle biológico na agricultura por tratar-se de isolados que apresentam certa persistência em condições adversas de temperatura, umidade e radiação UV.

Palavras-chaves: Hypocreales, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* e Sergipe.

Orientador: Marcelo da Costa Mendonça - UFS

OCCURRENCE, DISTRIBUTION AND CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN NATURAL AND CULTIVED SOILS

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the occurrence and diversity of entomopathogenic fungi at Sergipe state, considering the factors that affect their distribution. The analysis was done using soil samples collected in the three mesoregions of the state in two periods of collection, comprising a wet and a dry season, and in two different habitats (agricultural and natural). Parameters such as pH, organic matter and argil soil were considered in the analyzes. For the soil fungi isolation, two methods were used, the soil solution in culture medium and selective insect bait. In a total of 48 soil samples, 41.7% were positive for the presence of entomopathogenic fungi. The isolates were belonging to the genera Beauveria, Metarhizium and Isaria, from order Hypocreales. It was found that the factors related to soil sampling location (region, period, and habitat) showed no significant difference in their variables for the presence of entomopathogenic fungi, however other soil factors (pH, amount of organic matter and argil) showed significance. The isolates were submitted to genetic variability analysis by RAPD markers, where 15 primers were selected, producing a total of 179 bands (Beauveria) and 131 bands (Metarhizium) and the similarity matrices were made using the Jaccard coefficient, which generated dendrogram by the UPGMA method, for each fungus. There was low genetic similarity among isolates of both genders. In this work, the entomopathogenic fungi isolated can be useful for biological control in agriculture once these isolates show certain persistence in adverse conditions of temperature, humidity and UV radiation.

Keywords: Hypocreales, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* e Sergipe.

1. Introdução

O controle biológico natural de insetos-pragas é considerado um valoroso serviço ambiental (Losey e Vaughan, 2006), no entanto, a intensificação das práticas agrícolas nos agroecossistemas vem afetando a ocorrência e, consequentemente, a ação de inimigos naturais (Crowder et al., 2010). Segundo Jabbour et al. (2011), a riqueza de espécies de entomopatógenos e a conservação da sua biodiversidade podem fornecer benefícios adicionais ao controle microbiano de pragas.

O ambiente natural desses microrganismos é o solo já que é onde depositam seus esporos infectivos e onde permanecem durante determinadas fases do seu ciclo de vida, além de ser considerado o local mais apropriado para verificar a sua ocorrência em agroecossistemas (Medo e Cagán, 2011). Os entomopatógenos estão distribuídos geralmente de maneira heterogênea no solo, nos cadáveres de insetos ou próximo deles, assim quanto mais amostras de solo forem reunidas, maior é a frequência do isolamento e sugere-se que as amostras sejam limitadas da superfície até uma profundidade 10-15 cm da zona de matéria orgânica e/ou horizonte A (Inglis et al, 2012).

Fungos entomopatogênicos isolados do inseto-hospedeiro ou do solo e que apresentem potencial no controle de pragas muitas vezes são usados em formulações comerciais. No entanto, o sucesso dos bioinseticidas depende da sua habilidade de infectar e matar seu hospedeiro, persistir no ambiente e fornecer proteção em longo prazo (Medo e Cagán, 2011). Para utilização dos fungos como agentes entomopatogênicos deve-se considerar a disponibilidade e o custo da aquisição de cepas em bancos de germoplasmas, além de verificar a regulação para introduzir espécies exóticas no ambiente, portanto é importante explorar o ambiente local para detectar cepas fúngicas promissoras e virulentas *in situ* (Sánchez-Peña et al., 2011).

A ocorrência natural e a distribuição de fungos entomopatogênicos, assim como os fatores que podem afetar sua persistência no ambiente, como localização geográfica, tipo de habitat, condições climáticas e fatores referentes ao solo (pH, umidade, classe textural) tem sido objetivo de estudos em diversos países (Chandler et al., 1997; Meyling e Elienberg, 2006; Galán-Franco et al., 2011).

Com base no exposto, o objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência e distribuição de fungos entomopatogênicos em solos do estado de Sergipe, em diferentes regiões (sertão, agreste e litoral), períodos (seco e úmido) e habitats (agrícola e natural). Adicionalmente avaliou-se o efeito dos fatores relativos ao solo (pH, quantidade de matéria orgânica e argila) sobre esses microrganismos. Os isolados foram submetidos à análise de variabilidade genética através da técnica molecular RAPD. Pretende-se com esse trabalho

formar um banco de fungos entomopatogênicos, fornecendo possibilidades para um futuro programa de seleção de isolados.

2. Referencial Teórico

2.1. Biodiversidade de fungos entomopatogênicos

Biodiversidade ou diversidade ecológica pode ser definida como a variabilidade entre os seres vivos, incluindo a variação genética dentro e entre populações e o número de espécies e as diferenças entre os ecossistemas que as abrigam (Saccaro, 2011). Jabbour et al., (2011) observaram, em outros estudos, que o incremento da biodiversidade ajuda em muitos processos ecossistêmicos de importância ecológica e sócio-econômica, tais como controle biológico, resistência à invasão e resiliência a distúrbios. Contudo são relativamente poucos os trabalhos que tratam da diversidade dos patógenos (Crowder et al., 2010). Kirk et al. (2004) afirmaram que o conhecimento da diversidade microbiana é limitado pela pouca capacidade de se estudar os microrganismos presentes no solo.

Para conhecer a ecologia das populações dos fungos, os estudos devem ser feitos com coletas em escala local mas considerando as diferenças espaciais dentro do ecossistema. Os isolados serão representantes genotípicos que potencialmente interagem com a população de hospedeiros, uns com os outros e com o ambiente dentro das condições de campo (Meyling e Eilenberg, 2007)

O solo constitui um importante reservatório para diversidade de fungos entomopatogênicos, inclusive muitas espécies pertencentes à ordem Hypocreales (Ascomycota) habitam o solo por um período significante do seu ciclo de vida, quando não estão parasitando o seu artrópode-hospedeiro (Keller e Zimmerman, 1989). Portanto, diversos fatores como a localização geográfica, clima, habitat, altitude, pH do solo, quantidade de matéria orgânica impactam a presença das espécies fúngicas e a resposta de cada espécie a estas condições (Medo e Cagán, 2011).

Segundo Queseda-Moraga et al., (2007), o isolamento de fungos entomopatogênicos do solo é essencial para avaliar a biodiversidade desses microrganismos de ocorrência natural em determinada região e para fornecer agentes com potencial para serem usados em programas de controle biológico de pragas. Ainda afirmam que o conhecimento dos parâmetros que determinam a diversidade e a distribuição dessas espécies no solo ajudaria a identificar quais delas melhor se adequam a um determinado ambiente, tornando mais eficaz o controle biológico.

Estudos da biodiversidade de fungos entomopatogênicos são normalmente conduzidos com insetos iscas, como as lagartas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) e/ou *Galleria mellonella* (Lepidoptera) (Steenberg, 1995; Goble et al., 2010; Oddsdottir et al., 2010; Medo e Cagán, 2011). Meios de cultura seletivos, que impedem ou reduzem o crescimento de contaminantes, também são frequentemente usados para isolar fungos entomopatogênicos do solo (Doberski e Tribe, 1980; Liu et al., 1993; Freed et al., 2011).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos buscando isolar e caracterizar linhagens mais eficientes ao controle de pragas com o objetivo de explorar a biodiversidade dos principais gêneros da ordem Hypocreales de fungos entomopatogênicos: *Metarrhizium* spp. (Enkerli et al., 2005; Fernandes et al., 2010), *Beauveria* spp. (Reay et al., 2008; 2010), *Isaria* spp. (Fukatsu et al., 1997; Dalleau-Clouet et al., 2005) ou mesmo diversos gêneros em um mesmo estudo (Goble et al., 2010; Gálán-Franco et al., 2011).

2.2. Fatores que afetam os fungos entomopatogênicos no solo

O conhecimento dos fatores que controlam a ocorrência e abundância de fungos entomopatogênicos, a partir de uma perspectiva ecológica, fornece uma visão do que ocorre quando cepas de controle microbiano são liberadas no meio ambiente e pode ajudar a promover novas estratégias de exploração das populações naturais para conservação do controle biológico (Inglis et al., 2008).

Para a elucidação desses fatores, o solo se torna útil pois é considerado um excelente ambiente para os fungos entomopatogênicos pela proteção contra radiação UV e outros fatores adversos (Keller e Zimmerman, 1989). As altas temperaturas podem alterar as funções metabólicas e fisiológicas dos fungos, ocasionando mudanças na estrutura das moléculas e na ação enzimática (McCaig et al., 2001). Portanto, a radiação UV com irradiação direta da luz solar reduz a viabilidade dos conídios no campo e, consequentemente, o sucesso no controle microbiano de insetos (Santos et al., 2011).

A temperatura pode ser limitante para a maioria dos entomopatógenos já que os microrganismos não possuem mecanismos biológicos para se defender de grandes variações de temperatura, afetando o seu metabolismo em geral (Alves e Lecuona, 1998). Fernandes et al. (2008) observaram que fungos entomopatogênicos isolados em regiões mais distante da região equatorial apresentam uma maior germinação em condições frias quando comparada aos fungos isolados em regiões equatoriais. Adicionalmente, isolados encontrados próximo a linha do Equador são mais tolerantes a radiação UV (Braga et al., 2001).

Em ambientes tropicais e subtropicais, a matéria orgânica presente no solo tem importância como fonte de nutrientes, na retenção de cátions, complexação de elementos tóxicos e de micronutrientes, infiltração ou retenção de água, aeração e estabilidade da estrutura do solo, além de atuar como fonte de carbono, nitrogênio, enxofre e outros para organismos heterotróficos presentes no solo (Bayer e Mielniczuk, 2008). A água que é um importante fator na migração ou movimentação do patógeno e seu hospedeiro, na forma de chuva auxilia na movimentação nos diferentes tipos de solo e na distribuição dos conídios, influenciando a eficiência do fungo entomopatogênico como agente de controle microbiano (McCoy et al., 1992).

Segundo Meyling et al. (2011), o conhecimento da ocorrência espaço-temporal de fungos entomopatogênicos presentes abaixo e acima do solo de campos agrícolas é importante para identificar os nichos ecológicos dos fungos dentro do agroecossistema e para avaliar táxons com potencial para controle de pragas. Esses autores não observaram diferença entre as comunidades de fungos entomopatogênicos presentes no solo, entre os sistemas convencional e orgânico, no entanto, no sistema convencional foram observados mais artrópodes infectados em comparação ao orgânico. No entanto, Klingen et al. (2002) observaram uma ocorrência maior de fungos patogênicos a insetos em solos de cultivo orgânico.

Keller e Zimmermann (1989) sugeriram que a movimentação dos conídios de fungos entomopatogênicos difere de acordo com a composição de cada tipo de solo. A composição do solo e a água afetam a persistência e a ocorrência dos fungos patogênicos a insetos, solos arenosos favorecem a perda de conídios pela lixiviação (Quesada-Moraga et al., 2007), enquanto que solos com maiores teores de silte e argila favorecem a manutenção desse entomopatógenos devido à adsorbância dos conídios nas partículas de argila (Inglis et al., 2001).

A maioria dos fungos são tolerantes às variações de pH do solo e podem se desenvolver em uma ampla faixa, no entanto, a acidez do solo pode favorecer o desenvolvimento de alguns táxons (Standing e Killham, 2007). Inclusive, Medo e Cagán (2011) encontraram significante correlação entre o pH do solo e a presença dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*, isolados predominantemente em solo alcalinos, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*, em solos ácidos. Valores de pH maiores de 8,5 desfavorecem o isolamento de espécies fúngicas em geral, propondo que os fungos apresentam maior tolerância à acidez do que à alcalinidade do solo (Foth, 1984).

2.3. Caracterização de fungos entomopatogênicos

A identificação da maioria dos fungos entomopatogênicos depende da observação das características morfológicas sendo facilmente identificados, com relativa experiência, os gêneros dos entomopatógenos mais comuns e em alguns casos chega-se até a espécie, mas para isso é fundamental a confirmação de características microscópicas essenciais (Humber, 2012).

Nesse contexto, os métodos moleculares são uma poderosa ferramenta que facilitam a detecção, a identificação/caracterização, e/ou quantificação dos fungos, além de permitirem uma identificação direta, detecção e análise das características genéticas que não são possíveis diretamente quando usados os métodos morfológico, fisiológico e bioquímico (Inglis et al., 2012).

Em 1983, Harry Mullis desenvolveu uma técnica, conhecida por PCR (reação em cadeia de polimerase), que possibilitou amplificar regiões do DNA e comparar o tamanho dos fragmentos amplificados entre diferentes linhagens e espécies de fungos. Essa técnica envolve uma síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase, e a reação se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como primers que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo na amplificação (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Dentre as técnicas baseadas no PCR, diversos trabalhos utilizam RAPD para diferenciação de espécies ou linhagens de fungos patogênicos para invertebrados (Driver et al., 2000; Dalzoto et al., 2003; Velásquez et al., 2007). Essa técnica não necessita do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que compõe as extremidades do fragmento de DNA de interesse, sendo assim, fragmentos de DNA são amplificados no genoma através do uso de oligonucleotídeos simples, de sequências arbitrárias, que são utilizados como primers (Sosa-Gómez et al., 1998). Portanto, RAPD é considerado uma excelente ferramenta para identificação de espécies e isolados, ajudando na estimativa da variabilidade genética entre eles e na construção de dendogramas (Osborník et al., 2000), além de ser mais simples e barata quando comparada com outras técnicas moleculares.

As técnicas moleculares estão mais modernas e precisas, o sequenciamento de genes do DNA ribossomal (rDNA) ou do DNA mitocondrial (mDNA) oferecem resultados seguros sobre aspectos taxonômicos e filogenéticos para fungos entomopatogênicos (Rehner e Bluckey, 2005; Rehner et al., 2011; Bischoff et al., 2006), sendo as regiões do rDNA bastante utilizadas para identificação e diferenciação dos isolados (Galán-Franco et al., 2011; Garrido-Jurado et al., 2011). As regiões 18S e 28S são mais conservadas e podem ser usadas na diferenciação de gênero e espécies, enquanto que as regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e IGS (Intergenic Spacer) acumularam maior variabilidade e são

usadas na diferenciação de espécies ou isolados dentro de uma mesma espécie (Estevez-Zarzoso et al., 1999).

CAPÍTULO I

FATORES QUE AFETAM A OCORRÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLOS NATURAIS E CULTIVADOS

Ana Gorete Campos de Azevedo

Marcelo da Costa Mendonça

O manuscrito será submetido para possível publicação no periódico:
Journal of Invertebrate Pathology

CAPÍTULO I

FATORES QUE AFETAM A OCORRÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLOS NATURAL E CULTIVADO

RESUMO - Os fatores que afetam a ocorrência de fungos entomopatogênicos, nas três mesorregiões de Sergipe em função da sazonalidade e do habitat, foram avaliados a partir de amostras de solo coletadas. Fatores relativos ao solo, como pH, matéria orgânica e argila, foram considerados. Para o isolamento dos entomopatógenos, foram utilizados dois métodos, inseto-isca e meio de cultura seletivo. Do total de amostras, 41,7% foram consideradas positivas quanto à presença de fungos entomopatogênicos, com a predominância dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*. O pH do solo afetou a ocorrência dos fungos entomopatogênicos, predominantemente na faixa de 5,1 a 7 de pH. A matéria orgânica também influenciou a presença de fungos entomopatogênicos, com menor ocorrência em solos com menos de 0,7% de matéria orgânica. O solo das amostras foi predominantemente arenoso, influenciando na ocorrência dos entomopatógenos, que foram isolados em sua maioria de solos com baixos índices de argila. Os microrganismos foram observados nas três mesorregiões, não influenciando a ocorrência deles no solo. Os isolados do gênero *Metarhizium* foram predominantes no período seco, entretanto o período de coleta não influenciou a ocorrência de fungos entomopatogênicos mesmo que os entomopatógenos tenham ocorrido com maior frequência no período seco. O tipo de habitat (natural ou agrícola) não influenciou na ocorrência dos entomopatógenos, entretanto os isolados do gênero *Beauveria* foram mais frequentes em habitat natural. Os resultados demonstraram a ocorrência natural de fungos entomopatogênicos em solo no estado de Sergipe.

Palavras-chaves: Controle biológico, Hypocreales, Sergipe, fatores do solo e habitat.

FACTORS AFFECTING THE OCCURRENCE OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN NATURAL E CULTIVED SOILS

ABSTRACT - The factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in the three mesoregions of Sergipe state due to seasonality and habitat were evaluated from collected soil samples. Factors related to the soil, such as pH, organic matter and argil, were

considered. For the entomopathogenic fungi isolation, two methods were used: insect bait and selective culture medium. From the total sample, 41.7% were positive for the presence of entomopathogenic fungi, with the predominance of Beauveria, Metarhizium and Isaria genera. The soil pH affected the occurrence of entomopathogenic fungi predominantly in the range of 5.1 to 7. The organic matter also influenced the presence of entomopathogenic fungi with lower occurrence in soils with less than 0.7% of organic matter. The soil sample was predominantly sandy, influencing the occurrence of entomopathogenic fungi that were isolated mostly from soils with low argil index. The microorganisms observed in the three mesoregions, does not influence their soil occurrence. The isolates from Metarhizium genus were predominant in the dry season, however the period of collection did not influence the occurrence of entomopathogenic fungi even though entomopathogens have occurred more frequently in the dry season. The habitat type (natural or cultivated) did not influence the entomopathogens occurrence, however the isolates of Beauveria genus were more frequent in natural habitat. The results demonstrate the natural occurrence of entomopathogenic fungi in soil at Sergipe state.

Keywords: Biological control, Hypocreales, Sergipe, soil and habitat factors.

Introdução

O conhecimento da composição e distribuição das espécies de fungos presentes no solo é importante para que a população de entomopatogénos seja manejada de forma a facilitar o controle de pragas dentro do agroecossistema (Meyling e Eilenberg, 2006). As comunidades microbianas nesse ambiente podem alterar a disponibilidade dos nutrientes para as plantas afetando assim as populações de herbívoros, que também podem ser afetadas pela abundância de inimigos naturais presentes na microbiota do solo (Birkhofer et al., 2008; van der Putten et al., 2009).

O solo é considerado o ambiente natural dos fungos entomopatogênicos, onde depositam seus esporos infectivos e permanecem durante determinadas fases do seu ciclo de vida (Medo e Cagán, 2011). Muitas atividades antropogênicas, como desenvolvimento das cidades, agricultura, uso de pesticidas e poluição, podem afetar potencialmente a atividade microbiana do solo, no entanto, é desconhecido como as mudanças na diversidade microbiana afetam os ecossistemas presentes no solo, havendo, portanto, a necessidade de mecanismos confiáveis e precisos para estudar os microrganismos nesse ambiente (Kirk et al., 2004).

Diversos fatores afetam a persistência dos fungos entomopatogênicos no ambiente, tais como, localização geográfica, clima, habitat, altitude e pH do solo, além da presença de matéria orgânica e a resposta de cada espécie a esta variedade de condições (Medo e Cagán, 2011). Além disso determinados fatores ambientais, como temperatura, umidade e chuva, radiação e fotoperíodo, regulam a presença dos entomopatógenos no agroecossistema (Alves, 1998).

Os patógenos naturalmente disponíveis constituem-se numa alternativa eficiente, econômica e duradoura para o controle das pragas agrícolas e domésticas (Alves, 1998). Segundo Gulsar Banu et al. (2004) os isolados fúngicos do próprio ambiente teriam compatibilidade ecológica com as pragas e o risco de impacto é reduzido nos organismos não alvo quando comparados com isolados exóticos. Isolamento, identificação e seleção são etapas importantes no desenvolvimento de um programa de controle microbiano de pragas. O isolamento de fungos entomopatogênicos em determinado ambiente é essencial para informar sobre a biodiversidade local e fornecer um conjunto de agentes de controle biológico para ser conservado e utilizado dentro do agroecossistema para controle de pragas (Sevim et al., 2010).

O estado de Sergipe está subdividido em três mesorregiões, propícias ao estudo da diversidade de fungos entomopatogênicos. O sertão sergipano é caracterizado pela deficiência hídrica, em que a evapotranspiração é maior que a precipitação pluviométrica, a vegetação predominante é a caatinga e o solo é bastante pedregoso. A precipitação declina de leste para oeste e a aridez é crescente também nesse sentido. A região agreste representa a faixa de transição entre o litoral e o sertão, sendo bastante caracterizada pela produção agrícola, além da presença da Mata Atlântica. O leste sergipano, representado pela região litorânea, é caracterizado por ser a mais úmida das três mesorregiões, apresenta a maior pluviosidade e em geral possui solo bastante arenoso, em alguns pontos com presença das várzeas. Em geral os solos são ácidos, havendo um declínio da acidez à medida que se aproxima das regiões áridas (Franco, 1983).

Esse trabalho consistiu em avaliar o efeito dos fatores relativos ao solo (pH, matéria orgânica e argila) e da sazonalidade na ocorrência natural e na distribuição de fungos entomopatogênicos nas três mesorregiões do estado de Sergipe. E, consequentemente, isolar agentes de controle microbiano favorecendo posteriores trabalhos de seleção dos isolados potencialmente promissores.

Material e Métodos

1. Caracterização das áreas de coleta e amostragem do solo

As amostras de solo foram coletadas nas três mesorregiões do estado de Sergipe, sertão, agreste e leste, sendo assim determinado pelo interesse nas peculiaridades dos parâmetros endofoclimáticos de cada uma delas. A amostragem foi realizada em duas diferentes estações, uma seca (meses de Fevereiro e Março) e uma úmida (meses de Julho e Agosto) (tabela 1), e em dois habitats, considerando o uso do solo, cultivado (área com produção agrícola) e natural (área conservada, sem histórico de agricultura).

Tabela 1. Média da precipitação observada nas três mesorregiões de Sergipe relativa ao período seco e úmido de 2012.

Região	Precipitação (mm)*	Precipitação (mm)**
Sertão	32,75	78,5
Agreste	51,1	73,9
Leste	60,8	141,45

Fonte: Secretaria de Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos – SEMARH.

*Média da precipitação observada no período seco nos meses de Fevereiro e Março.

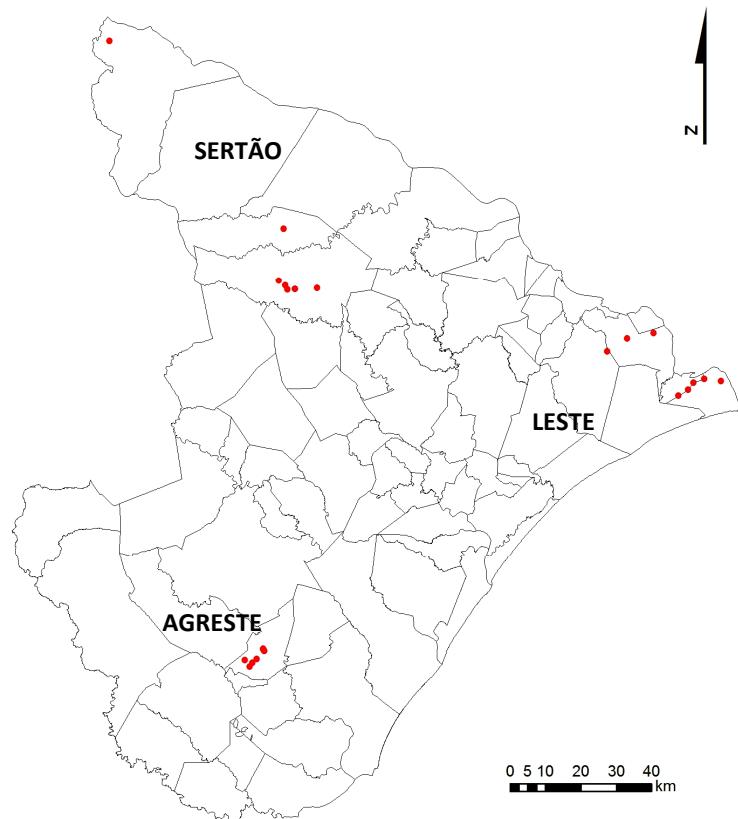
**Média da precipitação observada no período úmido nos meses de Julho e Agosto.

Em cada mesorregião foram estabelecidos quatro pontos de coleta para cada um dos habitats, com uma distância mínima entre eles de 2km. Em cada local de coleta foram escolhidos quatro pontos de amostragem, com dimensões de 1mx1m, onde foram coletadas 10 subamostras de solo que formaram uma amostra composta (Figura 1).

A amostra foi obtida no horizonte A, após a retirada da vegetação superficial, a uma profundidade de 10 cm, utilizando-se de um amostrador cilíndrico com 2,8 cm de diâmetro que foi desinfestado todas as vezes que havia a mudança de ponto de coleta para evitar contaminação entre eles. Em seguida, foram armazenadas em sacos plásticos estéreis de 1 kg e mantidas dentro de uma caixa de isopor durante o transporte até o laboratório.

Os pontos de amostragem foram identificados utilizando GPS (Global Positioning System). De cada ponto de coleta obteve-se uma amostra homogênea de todas as parcelas para as análises químicas e orgânicas do solo. De acordo com o resultado das análises, os

solos de cada ponto de coleta foram classificados de acordo com Ribeiro et al. (1999) e Sobral et al. (2007).



Fonte: Laboratório de Geotecnologias Aplicadas – Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Figura 2. Localização dos pontos de amostragem de solo em três mesorregiões do estado de Sergipe.

2. Isolamento de fungos entomopatogênicos do solo

Os experimentos foram desenvolvidos na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE, nos Laboratórios de Controle Biológico e Entomologia e na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq-USP), Piracicaba/SP, no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Pragas.

2.1. Método de suspensão do solo e meio de cultura seletivo

A metodologia de isolamento dos fungos entomopatogênicos diretamente do solo foi adaptada de Goettel e Inglis (1997). Em laboratório, as amostras compostas de solo provenientes de cada local de coleta foram intensamente homogeneizadas por agitação manual durante 30 segundos antes de serem peneiradas com o auxílio de uma peneira de metal com malha de 4 mm.

De cada amostra composta foram retirados 10 g de solo para que fosse feita a suspensão em erlenmeyer com capacidade de 250mL contendo 90 mL de água destilada estéril a 0,01% de espalhaste adesivo (Tween 80®). Cada suspensão foi devidamente homogeneizada em agitador do tipo Vortex por um período de 30 segundos. Em seguida, foram realizadas três diluições em série (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), que consistia na retirada de 1 mL da suspensão para ser diluída em 9 mL da solução de Tween 80® em tubos de ensaio. De cada diluição uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada, em duplicata, em placa de Petri (90 x 15 mm) estéril contendo meio seletivo, recomendado por Rangel et al. (2010), a solução foi espalhada de maneira uniforme utilizando-se uma alça de Drigalski estéril.

Após a inoculação da solução de solo no meio de cultura, as placas permaneceram abertas por alguns minutos até a secagem parcial da solução e após este período as placas foram incubadas invertidas (com o fundo voltado para cima) em câmara climatizada (*Biological Oxygen Demand – B.O.D*) a uma temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm10\%$ e escotofase de 24 horas de 5 a 7 dias.

Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença e ao crescimento das colônias. Posteriormente, as características macroscópicas e microscópicas dos microrganismos foram avaliadas e os propágulos de cada um dos diferentes fungos foram repicados individualmente e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura B.D.A. (batata, dextrose e ágar) até a obtenção de colônias puras, a exceção dos fungos saprófitos ou dos que não fossem de interesse. As amostras foram consideradas positivas quando confirmada a presença de ao menos uma colônia de entomopatógeno em alguma diluição dos pontos.

2.2. Método inseto-isca

As amostras de solo compostas foram misturadas manualmente por 30 segundos. Subamostras foram retiradas, peneiradas e transferidas para potes plásticos transparentes de 500g, com tampas perfuradas, deixando 2cm livre até o topo.

Dez larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) de 3º e 4º ínstars (aproximadamente quatro semanas após a eclosão), criadas no Laboratório de Entomologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros, foram selecionadas e transferidas para a superfície do

solo presente nos potes plásticos, esses insetos foi utilizado como modelo para extração de fungos entomopatogênicos do solo. As amostras foram umedecidas com água destilada estéril, quando necessário, para a manutenção da umidade durante o período da avaliação. Os potes foram acondicionados em sala climatizada a $25\pm1^{\circ}\text{C}$.

A partir do 3º dia, após a inoculação dos insetos no solo, iniciaram-se as inspeções de larvas mortas, sendo este procedimento realizado a cada dois dias por um período de três semanas ou até que todas as larvas tivessem morrido. As larvas mortas passaram por um processo de esterilização superficial para prevenir o crescimento externo de fungos saprofíticos contaminantes. Para o processo de esterilização, as larvas foram mergulhadas por dois segundos em álcool 70%, posteriormente, em uma solução de hipoclorito de sódio a 10% e para remoção do cloro, foram lavadas com água destilada estéril. Posteriormente, foram colocadas individualmente em placas de Petri (60 x 15 mm) revestidas com papel filtro estéril umedecido em água destilada estéril, formando-se uma câmara úmida e favorecendo a esporulação de fungos entomopatogênicos. As placas foram transferidas para câmara climatizada (B.O.D.), nas mesmas condições citadas no método anteriormente, a fim de proporcionar a esporulação dos fungos entomopatogênicos (Alves, 1998).

Quando confirmada a morte larval pela infecção do fungo através da visualização das estruturas, como micélio e conídios, adotou-se a técnica de transferência de estruturas do patógeno. Conforme sugerido por Alves (1998) retirou-se porções das estruturas do fungo com uma alça de platina, tocando a superfície do meio seletivo em placa de Petri em quatro pontos opostos. Após a transferência, as placas foram identificadas e colocadas nas mesmas condições indicadas anteriormente.

3. Identificação, purificação e conservação dos isolados

As colônias foram analisadas em relação aos aspectos morfológicos. Ao nível macroscópico foram verificados caracteres como o aspecto, a forma e a coloração das colônias no meio de cultura. Ao nível microscópico, foram visualizadas as estruturas reprodutivas (corpos de frutificação, conídios, esporos, conidióforos, fiálices) em lâminas, observadas em microscópio invertido e identificadas de acordo com chave taxonômica descrita por Humber (1996) e outras literaturas relevantes.

Após a identificação, em nível de gênero, foi feita a purificação do material, para obtenção da cultura pura. Em ambos os métodos o princípio utilizado para a purificação do material foi através das unidades formadoras de colônia (UFC's) obtidas através da suspensão de conídios. No método de suspensão de solo em meio seletivo houve

sucessivas repicagens em meio de cultura B.D.A. da colônia desejada, formada dentre tantas outras no meio seletivo, até purificá-la.

Para o método inseto-isca, as colônias obtidas diretamente do corpo do inseto foram repicadas em meio de cultura B.D.A. e após o desenvolvimento da colônia foram feitas diluições seriais a partir de uma solução conseguida com a raspagem das estruturas do fungo no meio de cultura e misturada em água destilada estéril a 0,01% de Tween 80®. Foram plaqueadas alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-4} e 10^{-5} e incubadas, após três dias as colônias desejadas foram repicadas para obtenção da cultura purificada.

Os fungos foram conservados para a formação de um banco (micoteca), quatro métodos foram escolhidos: a criopreservação, a liofilização, conídios em forma de pó seco e o método de Castellani. Os isolados foram armazenados no Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Tabuleiros Costeiros e do Laboratório de Controle Microbiano da Escola de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq).

4. Análise dos dados

Os dados foram tabelados e submetidos a uma análise estatística descritiva através do Programa SPSS v. 15.0, com a aplicação do Teste Qui-quadrado a um nível de significância de 5%, com o objetivo de avaliar o efeito dos fatores locais de amostragem do solo (local, período e habitat) e dos fatores reais ao solo (pH, matéria orgânica e argila), sobre a presença ou ausência de fungos entomopatogênicos.

Resultados e Discussão

De acordo com a caracterização morfológica, 41,7% das amostras de solo foram positivas para a presença de fungos entomopatogênicos, confirmado-se a presença dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*. Do total de amostras, foram consideradas positivas 31,2% para o gênero *Beauveria* spp., 25% para *Metarhizium* spp. e 4,2% para *Isaria* spp. Os três gêneros foram encontrados simultaneamente apenas no leste sergipano, no período úmido. Em outros estudos, que avaliaram a ocorrência de fungos entomopatogênicos no solo em determinadas regiões, foram obtidas amostras positivas em 71,7% do total de amostras na Espanha (Queseda-Moraga et al., 2007), 83% na Eslováquia (Medo e Cagán, 2011), 23% no México (Galán-Franco et al., 2011).

O efeito dos fatores referentes às características do solo (pH e quantidades de matéria orgânica e argila) e dos fatores relacionados às características dos locais de amostragem do solo (região, período e habitat) foram avaliados pelo teste do Qui-Quadrado

(Tabela 2). Houve diferença significativa para os fatores do solo, pH e matéria orgânica, demonstrando a influência desses fatores na presença dos isolados. A diferença foi não significativa para argila e para as características dos locais de amostragem do solo, região, período e habitat, em relação à ocorrência de fungos entomopatogênicos.

Tabela 2. Teste do Qui-Quadrado para os efeitos dos componentes variáveis do solo e das características dos locais de amostragem do solo na ocorrência dos fungos entomopatogênicos em Sergipe.

Fatores do solo*								
pH			Matéria Orgânica			Argila		
DF	Chi²	P	DF	Chi²	P	DF	Chi²	P
3	33,5	<0,0001	2	13,5	0,001	1	4,08	0,43
Fatores dos locais de amostragem do solo**								
Região			Período			Habitat		
DF	Chi²	P	DF	Chi²	P	DF	Chi²	P
2	,000	1,000	1	,000	1,000	1	,000	1,000

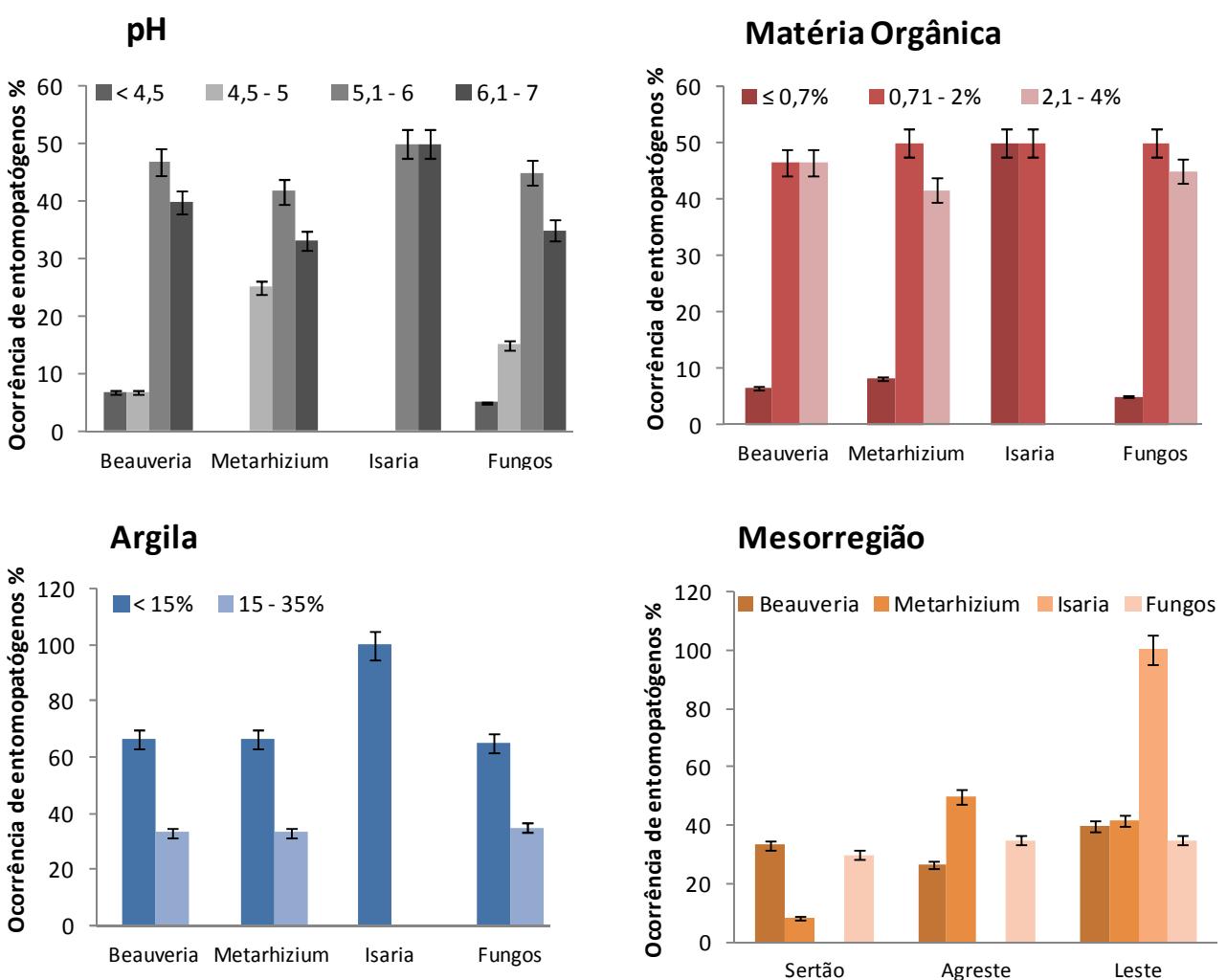
* Os valores das variáveis foram agrupados em intervalos: pH: 1:<4,5, 2: 4,5 a 5, 3: 5,1 a 6 e 4: 6,1 a 7; matéria orgânica: 1:<0,7%, 2: 0,71 a 2% e 3: 2,1 a 4%; argila: 1:<15% e 2: 15 a 35%.

** Os locais de amostragem foram caracterizados em três componentes: região: sertão, agreste e litoral; período: seco e úmido; habitat: cultivado e natural.

Os valores do pH do solo variaram entre 4,3 e 6,6. A presença dos fungos (45,5%) se concentrou no solo com pH de 5,1 a 6, considerado solos de acidez média (Figura 2). Queseda-Moraga et al. (2007) observaram correlação entre a ocorrência de fungos entomopatogênicos e o pH do solo, isolados de *B. bassiana* foram mais frequentes em pH bastante alcalino (8 – 8,5), considerando-se que o solo era predominantemente alcalino. No entanto, Medo e Cagán (2011) isolaram *M. anisopliae* em solo com pH mais alcalino (>6,5) e *B. bassiana* em pH mais ácido (<5,5). O gênero *Beauveria* spp. foi encontrado, no presente estudo, nas quatro faixas de pH enquanto que *Isaria* spp. esteve presente exclusivamente em solos com pH >5,1.

Mesmo com as amostras de solo apresentando baixo a médio índice de matéria orgânica, variando de 0,5 a 3,9%, houve influência na ocorrência dos fungos entomopatogênicos. Com isso, solos em que a matéria orgânica superou o índice de 0,71%

mostraram maior número de isolados (Figura 2). Esse resultado foi corroborado pelos estudos de Quesada-Moraga (2007) que sugerem que a correlação entre matéria orgânica e a presença do fungos se dá pela maior capacidade de trocas catiônicas em solos com maiores quantidade de matéria orgânica devida a adsorção dos conídios além de influenciar na diversidade e densidade de insetos hospedeiros no ambiente. Contudo, Meyling e Eilenberg (2006, 2007) observaram que o aumento da atividade biológica no solo, pela quantidade de matéria orgânica presente, afeta a persistência de fungos entomopatogênicos devido aos efeitos antagonistas, já que *Beauveria* e *Metarhizium* são menos competidores quando comparados aos microrganismos saprofíticos presentes no solo.



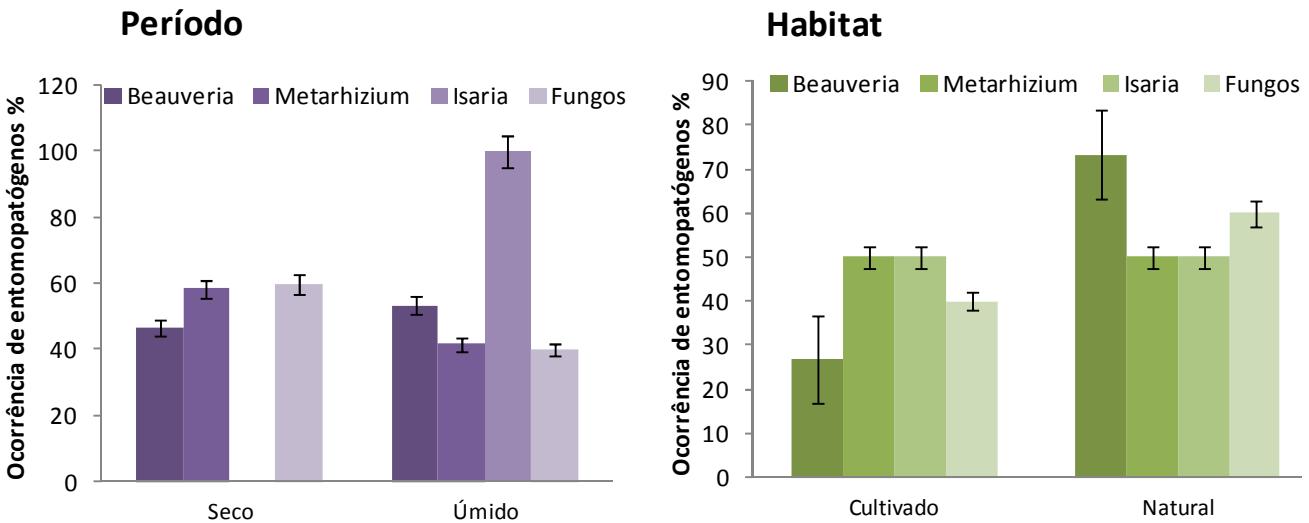


Figura 2. Efeito dos fatores de solo (pH, matéria orgânica e argila) e das características do local da amostragem do solo (mesorregião, período e habitat) na ocorrência de fungos entomopatogênicos em Sergipe.

*Fungos = total de fungos de *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* isolados.

Os solos foram predominantemente arenosos, com baixo ou médio teor de argila. Em algumas áreas, o solo apresentava alto teor de areia dificultando sua coleta com o amostrador, pois o mesmo não aderia às paredes deste equipamento, como na região leste em habitats naturais, por exemplo. Do total das amostras, 65% foram classificadas com baixo teor de argila (<15%), justificando que a maior ocorrência de fungos entomopatogênicos (>60%) tenha sido nesses solos (Figura 2).

Storey e Gardner (1987), após a aplicação de conídios de *B. bassiana* formulados em campo, observaram que a recuperação dos propágulos do fungo do solo foi correlacionada positivamente com a composição arenosa e negativamente com a quantidade de argila e silte. Vanninen et al., (1989) verificaram maior número de isolados de *M. anisopliae* em solos argilosos quando comparados a *B. bassiana* e *I. farinosus* que foram mais presente em solos fracos. Segundo Queseda-Moraga et al. (2007) espécies com conídios pequenos, como *Beauveria* spp., são mais abundantes em solos argilosos do que espécies com conídios maiores, como *Metarhizium* spp. Em relação ao percentual de fungos entomopatogênicos (60%) em solos com baixos teores de argila e considerando as condições climáticas durante os períodos das coletas, pode-se concluir que a maior ocorrência em solos arenosos se deve ao baixo índice pluviométrico na região de amostragem, possivelmente evitando a lixiviação dos conídios.

As diferentes regiões onde os fungos foram isolados não influenciaram em sua ocorrência, no entanto observa-se que o gênero *Beauveria* spp. foi mais frequente no litoral (40%), assim como *Isaria* spp. (100%) e *Metarhizium* spp. predominantemente na região leste (50%) (Figura 2). Esse resultado pode ser justificado verificando os índices pluviométricos dessas regiões, observa-se que o leste apresenta os maiores índices tanto no período seco quanto no úmido, seguido do agreste. Os períodos de amostragem do solo também não influenciaram na ocorrência dos fungos, no entanto 60% dos isolados foram coletados no período considerado o mais seco (Figura 2).

Considerando que alguns locais de coleta apresentam condições climáticas bastante adversas, como o sertão no período seco, o levantamento da ocorrência dos entomopatógenos pode ter selecionado indivíduos mais tolerantes a essas condições de temperatura, umidade, radiação UV, por exemplo. De acordo com Bidochka et al. (2001, 2002), a fase não patogênica do fungo em que ele se encontra no solo, pode ser a mais importante fase do seu ciclo de vida em relação ao seu estabelecimento permanente, já que condições abióticas adversas, como a exposição à radiação UV e altas temperaturas, selecionam isolados entomopatogênicos mais resistentes e capazes de sobreviver em habitats com essas características.

Não houve diferença significativa entre os habitats, agrícola e natural, em relação a presença dos entomopatógenos, entretanto, 60% dos isolados foram coletados em solos naturais (Figura 2), o que pode ser justificado pela ausência de práticas agrícolas efetivas nesse ambiente, como uso de produtos químicos e a manipulação do solo. Alguns estudos que avaliaram a presença de fungos patogênicos a insetos em relação ao tipo de habitat, não observaram diferença significativa quanto às amostras de solo oriundas de diferentes sistemas agrícolas (Goble et al., 2010; Meyling et al., 2011). Portanto, em geral, solos de uso agrícola não influenciam efetivamente a presença dos fungos entomopatogênicos.

A maior ocorrência dos isolados de *Beauveria* spp. foi observada em solos naturais (73,3%), entretanto, os gêneros *Metarhizium* e *Isaria* apresentaram igual distribuição nos dois habitats (Figura 2). Queseda-Moraga et al (2007) observaram que isolados de *B. bassiana* foram comuns em habitats agrícola e natural, sendo predominante no último, no entanto isolados de *M. anisopliae* foram mais comuns em solos agrícolas e sugeriram que estas espécies são mais tolerantes ao uso de pesticidas. Meyling e Eilerberg (2006) observaram maior frequência de *B. bassiana* em campos agrícolas enquanto *I. fumosorosea* foi mais frequente em áreas não cultivadas. Lavouras que utilizam práticas protetoras do solo, como o plantio direto, favorecem as populações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no solo quando comparadas a práticas que utilizam métodos mais convencionais, como aração e gradagem (Hummel et al., 2002). Meyling et al. (2009), para avaliar a diversidade de

Beauveria, coletaram solo da área cultivada e da área em volta, seminatural e observaram que a diversidade foi maior no habitat seminatural, o que pode ser explicado pela maior abundância e diversidade de inseto hospedeiro, o aumento da umidade, a radiação UV mais reduzida e maior estabilidade ambiental em comparação com a área agrícola que é estruturalmente mais simples e mais afetada pelas práticas agrícolas.

Conclusões

Os fungos entomopatogênicos predominantes nas três mesorregiões estudadas, sertão, agreste e leste, foram dos gêneros *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. e *Isaria* spp. Houveram isolados de fungos entomopatogênicos nos dois períodos avaliados, seco e úmido, no entanto não podemos garantir que nessas condições há o desencadeamento de um processo de epizootia natural. A ocorrência de fungos patogênicos a insetos foi observada em habitats naturais e, também, agrícolas, mesmo que nesses haja uma intensificação da utilização e do manejo do solo.

Esse estudo forneceu informações sobre a ocorrência natural em solo de fungos patogênicos a insetos e quais gêneros foram mais frequentes em Sergipe, contribuindo assim para o desenvolvimento do controle biológico regional além de selecionar bioagentes persistentes e compatíveis às condições dessa região.

Referências

- ALVES, S. B., ALMEIDA, J. E. M., MOINO JR, A., ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. IN: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.20, p. 637-710.
- BIDOCHKA, M. J., KAMP, A. M., LAVENDER, T. M., DEKONING, J., de CROOS, J. N. A. Habitat association in two genetic groups of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1335–1342, 2001.
- BIDOCHKA, M. J., MENZIES, F. V., KAMP, A. M. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. **Archives of Microbiology**, v. 178, p. 531–537, 2002.

BIRKHOFER, K., BEZEMER, T. M., BLOEM, J., BONKOWSKI, M., CHRISTENSEN, S., DUBOIS, D., EKELUND, F., FLIESSBACH, A., GUNST, L., HEDLUND, K., MADER, P., MIKOLA, J., ROBIN, C., SETALA, H., TATIN-FROUX, F., VAN DER PUTTEN, W. H., SCHEU, S. Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: implications for soil quality, biological control and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2297–2308, 2008.

FRANCO, E. **Biogeografia do Estado de Sergipe**. 1983, Aracaju, p. 13-133.

GALÁN-FRANCO, L. A., MORALES-LOREDO, A., ALVARES-OJEDA, G., LÓPEZ-ARROYO, J. I., ARÉVALO-NIÑO, K., SANDOVAL-CORONADO, C., QUINTERO-ZAPATA, I. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from citrus-growing areas of Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 36(4), p. 443-449, 2011.

GOBLE, T. A., DAMES, J. F., HILL, M. P., MOORE, S. D. The effects of farming system, habitat type and bait type on the isolation of entomopathogenic fungi from citrus soils in the Eastern Cape Province, South Africa. **BioControl**, v. 55, p. 399–412, 2010.

GOETTEL, M.S., INGLIS, G.D. Fungi: Hyphomycetes. IN: LACEY, L. A. (Ed.) **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic Press, San Diego, USA., 1997, pp. 213-249.

GULSAR BANU J., SUBAHASAN K., IYER R. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in white grub endemic areas of Kerala. **J Plant Crops**, v. 32, p. 333–334, 2004.

HUMBER, R.A. Fungi – Preservation. In: Lacey, L.A. (Ed.), **Biological Techniques in Invertebrate Pathology**. Academic Press, London. 1996.

HUMMEL, R. L., WALGENBACH, J. F., BARBERCHECK, M. E., KENNEDY, G. G., HOYT, G. D., ARELLANO, C. Effects of production practices on soil-borne entomopathogens in western North Carolina vegetable systems. **Environmental Entomology**, v. 31, p. 84–91, 2002.

KIRK, J. L., BEAUDETTE, L. A., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIRONOMOS, J. N., LEE, H., TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

MEDO, J., CAGÁN, L. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, v. 59, p. 200-208, 2011.

MEYLING, N. V., EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 113, p. 336–341, 2006.

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

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

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

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

RANGEL, D. E. N., DETTENMAIER, S. J., FERNANDES, E. K. K., ROBERTS, D. W. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, p. 375–389, 2010.

RIBEIRO, A. C., GUIMARÃES, P. T. G., ALVAREZ V., V. A. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais.** Viçosa, MG, 1999, p. 359.

SEVİM, A., DEMİR, I., HÖFTEM, M., HUMBER, R. A., DEMIRBAG, Z. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. **BioControl**, v. 55, p. 279-297. 2010.

SOBRAL, L. F., VIEGAS, P. R. A., SIQUEIRA, O. J. W., ANJOS, J. L., BARRETTO, M. C. V., GOMES, J. B. V. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes no Estado de Sergipe.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007, p. 251.

STOREY, G. K., GARDNER, W. A. Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through four Georgia soil types. **Environmental Entomology**, v. 16, p. 178-181, 1987.

VAN DER PUTTEN, W. H., BARDGETT, R. D., DE RUITER, P. C., HOL, W. H. G., MEYER, K. M., BEZEMER, T. M., BRADFORD, M. A., CHRISTENSEN, S., EPPINGA, M. B., FUKAMI, T., HEMERIK, L., MOLOFSKY, J., SCHADLER, M., SCHERBER, C., STRAUSS, S. Y., VOS, M., WARDLE, D. A. Empirical and theoretical challenges in aboveground–belowground ecology. **Oecologia**, v. 161, p. 1–14, 2009.

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

CAPÍTULO II

VARIABILIDADE GENÉTICA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS EM HABITAT AGRÍCOLA E NATURAL

Ana Gorete Campos de Azevedo

Marcelo da Costa Mendonça

Leandro Eugenio Cardemone Diniz

O manuscrito foi submetido para possível publicação na revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira

Diversidade genética de fungos entomopatogênicos coletados em solos de habitat agrícola e natural.

Ana Gorete Campos de Azevedo¹; Marcelo da Costa Mendonça² e Leandro Eugenio Cardamone Diniz³

⁽¹⁾ Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, 49060-100, Aracaju, SE. ⁽²⁾ Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais /Unit-ITP/Emdagro, Av. Beira Mar, 3250, 49025-040, Aracaju, SE, E-mail:marcelom@cpatc.embrapa.br ⁽³⁾ Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, 3250, 49025-040, Aracaju, SE,

Email: anagorete@ymail.com; marcelom@cpatc.embrapa.br e leandro.diniz@embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética, através de marcadores moleculares do tipo RAPD, de 19 isolados de *Beauveria* e 13 de *Metarhizium* coletados em dois habitats diferentes (agrícola e natural), em três mesorregiões do estado de Sergipe (sertão, agreste, leste) e em dois períodos (seco e úmido). Foram selecionados 15 primers RAPD para esta análise, os quais geraram um total de 179 bandas para os isolados de *Beauveria* com 60,8% de bandas polimórficas. Para *Metarhizium* foi gerado um total de 131 bandas das quais 26,7% foram polimórficas. Foram gerados dendrogramas para cada gênero, e pode-se verificar que os isolados de *Beauveria* apresentaram maior similaridade entre seus isolados, oito com mais de 50% de similaridade. Os isolados de *Metarhizium* apresentaram grande variabilidade genética, somente três destes isolados apresentaram mais de 50% de similaridade. Embora tenha sido identificada a formação de agrupamentos, para ambos os gêneros, e em alguns casos com similaridade superior a 70%, observou-se alta variabilidade genética entre os isolados de fungos entomopatogênicos.

Termos para indexação: *Beauveria*, *Metarhizium*, similaridade genética, RAPD.

Genetic variability of entomopathogenic fungi isolates in soils of agricultural and natural habitats

Abstract - The aim of this work was to evaluate the genetic variability through RAPD markers of 19 isolates of Beauveria and 13 of Metarhizium collected in two different habitats (agricultural and natural), three meso state of Sergipe (semiarid, agreste, east) and two seasons (dry and wet). Fifteen primers of RAPD were selected for this analysis, which generated a total of 179 bands for Beauveria isolates with 60.8% of polymorphism. For Metarhizium was generated a total of 131 bands of which 26.7% were polymorphic. Dendograms for each gender was generated, and could be seen that Beauveria isolates showed greater similarity between their isolates, eight with more than 50% of similarity. The Metarhizium isolates showed high genetic variability, only three of this isolates showed more than 50% of similarity. Although groups has been formed, for both genders, and in some cases with similarity higher than 70%, there was a high genetic variability among isolates of entomopathogenic fungi.

Index terms: *Beauveria*, *Metarhizium*, genetic similarity, RAPD.

Introdução

Os aspectos ecológicos e a biodiversidade das comunidades de organismos presentes nos agroecossistemas são importantes para o estudo do controle biológico de pragas. Os fungos entomopatogênicos, que formam a microbiota de ecossistemas com características espaciais diferentes, fornecem informações sobre os genótipos representantes da população e a forma de interação entre eles, com os hospedeiros e com o meio ambiente (Meyling e Eilenberg, 2007). Os fungos anamorfos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin da ordem Hypocreales (Ascomycota) são inimigos naturais de um grande número de artrópodes e apresentam distribuição cosmopolita (Roberts e St. Leger, 2004; Enkerli et al., 2005).

A seleção de genótipos de fungos eficazes para programas de controle microbiano e a compreensão de fatores que controlam a epizootia é importante para conhecer como as populações estão genéticamente representadas (Inglis et al., 2008). Diversos estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de agrupar e identificar isolados de fungos entomopatogênicos em relação à diversidade genética e sua origem: isolados do mesmo local de origem (Fernandes et al., 2006; Inglis et al., 2008); isolados de locais diversos (Fernandes et al., 2009; Freed et al., 2011), entomopatogênicos isolados da mesma espécie

de artrópode-hospedeiro (Neuvéglise et al., 1997; Reber e Chapuisat, 2012), isolados de habitats semelhantes (Bidochka et al., 2002; Ouveley et al., 2009).

Técnicas de biologia molecular tem sido úteis para avaliar a diversidade genética entre isolados de fungos entomopatogênicos, dentre elas técnicas baseadas em PCR, como microssatélites ou SSR (Dalleau-Clouet et al., 2005) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Castrillo et al., 2003), além de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Devi et al., 2006), e outras técnicas que não utilizam PCR, como a análise isoenzimática (St Leger et al., 1992), ou ainda, combinações desses métodos (Fernandes et al., 2009).

O RAPD é uma técnica baseada na PCR, em que um *primer* com uma sequência arbitrária de nucleotídeos, pode amplificar o DNA genômico sem a necessidade de conhecimento prévio da das bases do DNA alvo (Baumann et al., 2003). O polimorfismo em RAPD é resultado de mudanças na sequência do DNA que inibem a ligação do *primer* ou pela interferência na amplificação em determinado iniciador para alguns indivíduos, assim alguns marcadores podem ser detectados em um indivíduo e em outro não (Semagn et al., 2006). Desta forma, o polimorfismo genético é de natureza binária, ou seja, o segmento amplificado estará presente ou ausente no gel (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Baumann et al., 2003).

A técnica PAPD possibilita o estudo da variabilidade ou polimorfismo genético, caracterização dos isolados de fungos de uma mesma espécie, dentre outros. Além do menor custo quando comparado a outras técnicas, apresentam menor número de etapas, reduzindo o tempo para obtenção dos resultados, além de exigir pouco material genético e de serem livres de interferências ambientais (Ferreira e Grattapaglia, 1998). No entanto, sugere-se que o RAPD seja associado a outra técnica, que pode ser o estudo da morfologia do fungo, afim de se obter um resultado mais consistente sob o aspecto da agregação genética e das características do organismo.

Portanto, esse estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de isolados de *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp., provenientes de três mesorregiões de Sergipe, através da técnica molecular RAPD, associando aos resultados as informações relativas a origem, habitat, período e método de coleta dos fungos.

Materiais e Métodos

As atividades foram realizadas nos Laboratórios de Controle Biológico e Biologia Molecular, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE. Os fungos entomopatogênicos foram coletados em três mesorregiões do estado de Sergipe e estão

conservados em micoteca. Foram avaliados 19 isolados pertencentes ao gênero *Beauveria* e 13 isolados pertencentes ao gênero *Metarhizium*, identificados em relação à região onde foram coletados, ao período e o habitat (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de isolados dos gêneros *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp. de acordo com a região, período e habitat.

Isolados	Região	Período	Habitat
<i>Beauveria</i> 1	Sertão	Seco	Mata
<i>Beauveria</i> 2	Leste	Úmido	Mata
<i>Beauveria</i> 3	Agreste	Seco	Mata
<i>Beauveria</i> 4	Leste	Úmido	Agrícola
<i>Beauveria</i> 5	Sertão	Seco	Mata
<i>Beauveria</i> 6	Leste	Seco	Mata
<i>Beauveria</i> 7	Leste	Úmido	Mata
<i>Beauveria</i> 8	Sertão	Seco	Agrícola
<i>Beauveria</i> 9	Leste	Úmido	Mata
<i>Beauveria</i> 10	Sertão	Seco	Mata
<i>Beauveria</i> 11	Agreste	Úmido	Mata
<i>Beauveria</i> 12	Leste	Úmido	Agrícola
<i>Beauveria</i> 13	Sertão	Seco	Mata
<i>Beauveria</i> 14	Sertão	Seco	Mata
<i>Beauveria</i> 15	Agreste	Úmido	Mata
<i>Beauveria</i> 16	Sertão	Seco	Mata
<i>Beauveria</i> 17	Agreste	Úmido	Mata
<i>Beauveria</i> 18	Agreste	Úmido	Agrícola
<i>Beauveria</i> 19	Agreste	Seco	Mata
<i>Metarhizium</i> 1	Agreste	Úmido	Mata
<i>Metarhizium</i> 2	Agreste	Úmido	Agrícola
<i>Metarhizium</i> 3	Agreste	Seco	Agrícola
<i>Metarhizium</i> 4	Agreste	Úmido	Agrícola
<i>Metarhizium</i> 5	Agreste	Seco	Mata
<i>Metarhizium</i> 6	Agreste	Seco	Agrícola
<i>Metarhizium</i> 7	Sertão	Seco	Agrícola
<i>Metarhizium</i> 8	Leste	Úmido	Mata
<i>Metarhizium</i> 9	Agreste	Seco	Agrícola

<i>Metarhizium</i> 10	Leste	Úmido	Mata
<i>Metarhizium</i> 11	Agreste	Seco	Agrícola
<i>Metarhizium</i> 12	Leste	Seco	Mata
<i>Metarhizium</i> 13	Agreste	Úmido	Mata

Para obtenção do micélio, os fungos entomopatogênicos foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar). Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada (*Biological Oxygen Demand* – B.O.D) a uma temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm10\%$ e escotofase de 24 horas por um período de dez dias.

Após o crescimento das colônias e a esporulação de cada fungo, os conídios foram transferidos junto com o meio com o auxílio de um vazador (5 mm) para erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura; 10 g.L^{-1} de dextrose; $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona e 500 mg.L^{-1} do antibiótico cloranfenicol). Os erlenmeyers foram colocados em uma mesa agitadora a 150 rpm, a uma temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$ no escuro, durante cinco dias para produção de micélio, constituindo-se no inóculo para extração do DNA. Após o crescimento do fungo, o meio líquido foi filtrado em bomba de vácuo para obtenção do micélio que foi seco em câmara de fluxo laminar e armazenado em freezer a -20°C .

Aproximadamente 1 g do micélio foi utilizado para extração do DNA com o DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Canadá), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras de DNA obtidas foram quantificadas em espectofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific) e as concentrações de uso foram ajustadas a 20 ng/ μL .

Para amplificação do DNA foram utilizados inicialmente 22 primers RAPD para todas as amostras de DNA (Tabela 2). As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 20 μL contendo: 20ng de DNA, 1 μL do iniciador ($0,5 \mu\text{M}$), 12,4 μL de água ultrapura esterilizada, 2 μL de tampão 10x, 0,40 μL de dNTP (10 mM), 1U de Taq DNA polimerase (Neo Taq).

Tabela 2. Relação dos primers utilizados no RAPD e avaliados para *Beauveria* e *Metarhizium*.

Primers	Sequência 5' - 3'	Primers	Sequência 5' - 3'
A 01	CAGGCCCTTC	A 19	CAAACGTCGG
A 02	TGCCGAGCTG	B 01	GTTTCGCTCC
A 03	AGTCAGCCAC	B 02	TGATCCCTGG
A 04	AATCGGGCTG	B 03	CATCCCCCTG

A 05	AGGGGTCTTG	B 09	TGGGGGACTC
A 10	GTGATCGCAG	B 11	GTAGACCCGT
A 11	CAATGCCGT	C 02	GTGAGGCCTC
A 12	TCGGCGATAG	D 02	GGACCCAACC
A 15	TTCCGAACCC	F 02	GAGGATCCCT
A 16	AGCCAGCGAA	H 01	GGTCGGAGAA
A 17	GACCGCTTGT	I 02	GGAGGAGAGG

O material foi amplificado em um termociclador *Axygen®* programado para uma desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 36°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e TBE 1X, por 50 minutos a 100 V e corados em brometo de etídeo. Os géis foram fotodocumentados com o equipamento Loccus L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil) para posterior análise.

Os dados obtidos a partir dos géis de RAPD foram analisados e convertidos em variáveis binárias, onde o número “1” (um) significa a presença da banda do DNA do fungo e o número “0” (zero) a ausência. Esta matriz binária foi analisada pelo software DARwin, que gerou uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de JACCARD (Sneath e Sokal, 1973). A partir dos dados desta matriz foi construído um dendograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetical averages).

Resultados e Discussão

Utilizando como parâmetro a presença de bandas mais fortes e bem definidas, foi verificado que dos 22 *primers* inicialmente amplificados 15 registraram bandas que permitiram a analisar o registro da presença de DNA (Tabela 3).

Tabela 3. Iniciador, número de fragmentos polimóficos (NFPB e NFPM) e o número total de fragmentos (NTFB e NTFM), para *Beauveria* e *Metarhizium*, respectivamente.

Iniciador	NFPB	NTFB	NFPM	NTFM
A 01	05	14	09	19
A 03	05	08	04	05
A 04	08	12	00	03
A 05	10	21	06	12

A 10	09	16	10	17
A 11	06	06	06	11
A 12	09	11	04	04
A 15	06	10	07	07
A 16	07	09	03	06
A 19	11	18	03	06
B 01	05	14	02	05
B 02	00	01	04	06
B 11	12	15	02	04
D 02	10	11	06	16
F 02	06	13	09	10
Total	109	179	75	131

A partir dos 15 *primers* selecionados, foram obtidos 179 produtos de amplificação para os isolados de *Beauveria* spp., os quais forneceram uma média de 12,78 fragmentos por *primer*, destes 109 foram polimórficos. O maior número de fragmentos polimórficos foi registrado com o *primer* B-11 (com 12 bandas polimórficas), enquanto que com o *primer* B-02 não foi verificado polimorfismo. Para os isolados de *Metarhizium* spp. foram obtidos 131 produtos de amplificação, com uma média de 9,36 fragmentos por *primer*, o maior número de fragmentos polimórficos foi encontrado com o *primer* A-10 (com 10 bandas polimórficas), já com *primer* A-04 foi detectado apenas bandas monomórficas.

A análise do dendrograma gerado para os 19 isolados de *Beauveria* spp. (Figura 1) evidenciou a formação de três grupos distintos, sendo um grupo formado por um único isolado e os dois grupos formados pelos demais isolados.

Os maiores índices de similaridade foram observados entre os isolados *Beauveria* 6 e *Beauveria* 8, com cerca de 75% de similaridade, ambos coletados em diferentes regiões e habitats, porém coletados no mesmo período do ano (seco), já os isolados *Beauveria* 13 e *Beauveria* 16 apresentaram similaridade de cerca de 68%, sendo ambos isolados em condições bastante semelhantes (sertão/seco/mata). Em um dos grupos, formado por 07 isolados, todos foram provenientes de área de mata, a exceção do isolado *Beauveria* 18 (agrícola) e se apresentaram dentro de uma faixa de similaridade de 15 a 68%. Com o grupo formado por 11 isolados não foi observada uma correlação da sua origem com o agrupamento e se apresentaram dentro de uma faixa de similaridade que variou de 30 a 75%. O isolado *Beauveria* 15 não apresentou similaridade a nenhum outro deste trabalho.

Pela análise do dendrograma foi possível observar que a região e o período não determinaram a formação dos grupos, exceto para os isolados de *Beauveria* 10, 13, 14, 16,

17 e 19 que foram coletados no mesmo habitat (mata), estes se agruparam mesmo apresentando ampla faixa de similaridade genética, entre 18 e 67%.

Mendonça et al. (2012), verificando a variabilidade genética através de RAPD entre 11 isolados de *Beauveria bassiana* dos quais 8 foram originários de Sergipe, observaram uma média de 38,6% de similaridade, mostrando assim diversidade genética entre os isolados, sendo que maior índice de similaridade foi de 74%.

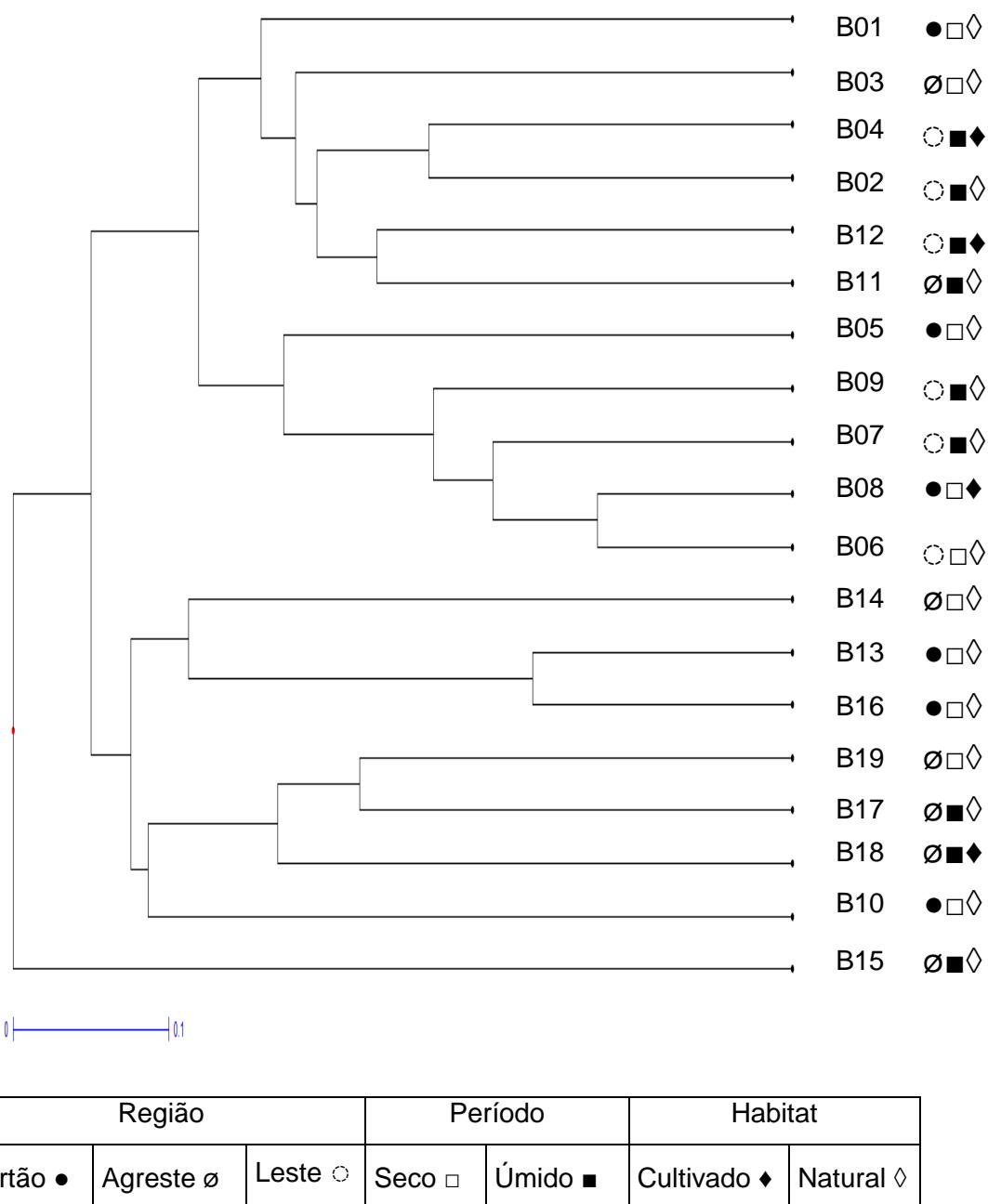


Figura 1. Dendrograma de similaridades entre 19 acessos de *Beauveria* spp., para análise de RAPD, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

Berreta et al. (1998) detectaram alta similaridade genética entre amostras de *B. bassiana* da Argentina e do Brasil isoladas de espécies de hospedeiros diferentes e sugeriram que não houve correlação com a origem geográfica ou do hospedeiro dos isolados. Pires (2002) detectou variabilidade genética entre as linhagens de *B. bassiana*, com nível de similaridade em torno de 70%, no entanto não detectou correlação entre grupos de similaridade e hospedeiro ou origem geográfica.

Ferri et al. (2012) avaliaram a variabilidade genética de isolados de *B. bassiana* obtidos em diversas regiões do Brasil e encontraram 92% de bandas polimórficas, verificando a formação de dois grupos de isolados mas não verificou-se correlação entre eles e os locais de origem. Carneiro et al. (2008) avaliaram isolados de *Beauveria* spp. e através de RAPD verificaram que 20 entre 24 isolados de *foram* agrupados de acordo com o inseto hospedeiro e com a patogenicidade contra a lagarta-do-cartucho do milho, a alta similaridade entre eles é justificada devido a reprodução assexuada desse fungo e por os isolados serem provenientes da mesma região.

O dendrograma obtido com os 13 isolados de *Metarhizium* spp. mostrou a formação de dois grupos, um deles com dois isolados e no outro grupo a formação de três subgrupos (Figura 2).

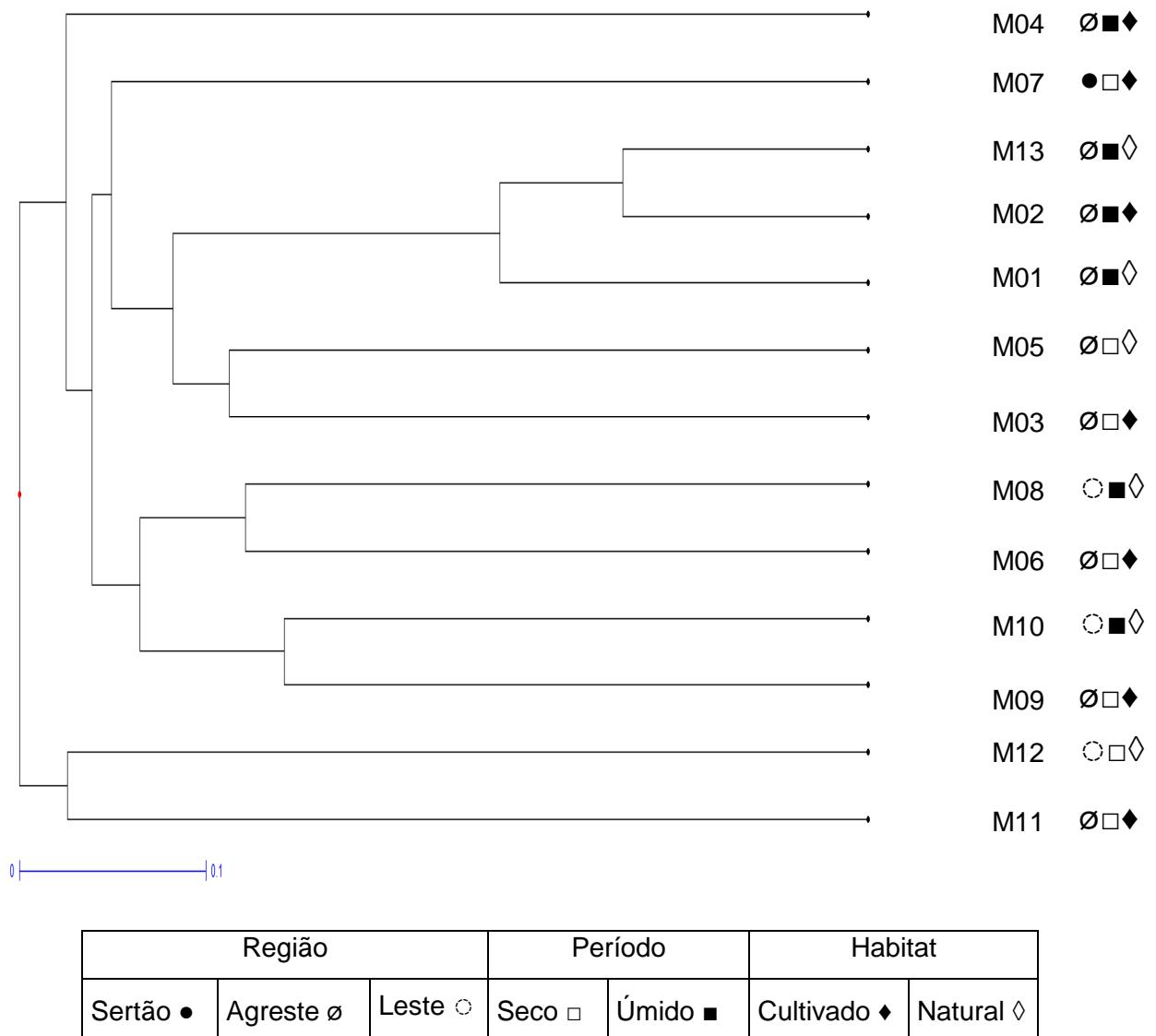


Figura 2. Dendograma de similaridades entre 13 acessos de *Metarhizium* spp., para análise de RAPD, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

Os dois isolados que se agruparam com maior afastamento genético foram os isolados *Metarhizium* 11 e 12, ambos isolados no mesmo período (seco), mas de regiões e habitats diferentes. Apesar do agrupamento, estes isolados apresentaram baixa similaridade genética, menos de 20%. Todos os isolados do outro grupo apresentaram uma similaridade genética entre 20 e 60%, a exceção dos isolados de *Metarhizium* 2 e 13 que foram provenientes do mesmo local e período, apresentando cerca de 75% de similaridade genética. Dentro desse agrupamento foi observado que um dos subgrupos apresentou os cinco isolados provenientes da região agreste, no entanto, houveram outros da região

agreste não agrupados, indicando que podem haver isolados de espécies diferentes dentro de uma mesma região.

Magalhães et al. (2003) caracterizou um isolado de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* do Peru e o comparou com três isolados da mesma espécie, do Brasil, por RAPD e encontrou similaridade genética entre eles. Macedo (2005) avaliou vinte isolados de *Metarhizium* spp que apresentaram um nível de 72,5% de similaridade, concluindo que essa alta similaridade indicava que os isolados seriam da mesma espécie, mas que não havia um padrão-específico de agrupamento entre aqueles oriundos da mesma região ou hospedeiro. No entanto, Velásquez et al. (2007) verificaram alta diversidade entre 350 isolados de *Metarhizium* spp. da região centro-sul do Chile, apresentando cerca de 41% de similaridade, o que levou a conclusão de que a diversidade não estava associada a origem geográfica dos isolados.

RAPD demonstrou ser uma ferramenta rápida e segura para detectar diversidade genética entre fungos entomopatogênicos, do mesmo gênero, que estejam relacionados.

Conclusões

1. O uso de RAPD e a correlação com os dados de origem foram suficientes para verificar a diversidade genética dos isolados de fungos entomopatogênicos
2. Os isolados *Beauveria* 6 e 8 foram os que apresentaram maior similaridade genética (75%), ambos coletados no período seco.
3. Não houve correlação entre a região, período de coleta e habitat com a presença dos isolados obtidos de *Beauveria*.
4. Nove entre treze isolados de *Metarhizium* foram da região agreste, no entanto houve alta variabilidade genética entre eles.
5. Os isolados *Metarhizium* sp2 e sp13 foram os que apresentaram maior similaridade genética (72%).

Referências

BAUMANN, R., SCHUBERT, R., HEITLAND, W., AUGER-ROZENBERG, A. A., FAIVRE-RIMPANT, P., MÜLLER-STARCK, G. Genetic diversity within and among populations of *Dipion pini* (Hym., Diprinidae) determined by random amplified polymorphic DNA-

polymerase chain reaction of haploid males. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 258-264, 2003.

BERRETA, M. F.; LECUONA, R. E.; ZANDOMENI R. O.; & GRAU, O. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.145-150, 1998.

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

CARNEIRO, A. A., GOMES, E. A., GUIMARÃES, C. T., FERNANDES, F. T., CARNEIRO, N. P., CRUZ, I. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, 2008.

CASTRILLO, L. A., VANDERBERG, J. D., WRAIGHT, S. P. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence characterized amplified region markers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, p. 75-83, 2003.

DALLEAU-CLOUET, C., GAUTHIER, N., RISTERUCCI, M., BON\$, M. C., FARGUES, J. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5 , p. 496–498, 2005.

DEVI, K. U., REINEKE, A., REDDY, N. N. R., RAO, C. U. M., PADMAVATHI, J. Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Genome**, v. 49(5), p. 495(10), 2006.

ENKERLI, J., KÖLLIKER, R., KELLER, S., WIDMER, F. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 384-386, 2005.

FERNANDES, E. K. K., COSTA, G. L., MORAES, A. M. L., ZAHNER, V., BITTENCOURT, V. R. E. P. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, v. 98, p. 324–332, 2006.

FERNANDES, E. K. K., MORAES, A. M. L., PACHECO, R. S., RANGEL, D. E. N., MILLER, M. P., BITTENCOURT, V. R. E. P., ROBERTS, D. W. Genetic diversity among Bazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 760-774, 2009.

- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília: Embrapa Cenargen, 1995.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. Ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998.
- FREED, S., JING, F. L., REN, S. X. Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from different geographical origins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27(2), p. 359-370, 2011.
- FERRI, D.V., MUNHOZ, C. F., NEVES, P. M. O., FERRACIN, L. M., SARTORI, D., VIEIRA, M. L. C., FUNGARO, M. H. P. Genetic variability of *Beauveria bassiana* and a DNA marker for environmental monitoring of a highly virulent isolate against *Cosmopolites sordidus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52(4), p. 569-574, 2012.
- INGLIS G. D., DUKE, G. M., GOETTEL, M. S., KABALUK J. T. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 101–113, 2008.
- MACEDO, D. **Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar.** 2005. 85p.Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba.
- MAGALHÃES, B. P., TIGANO, M.S., MARTINS, I., FRAZÃO, H., RAMIREZ, H. G. Characterization of a Peruvian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, a pathogen of grasshoppers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n.12, 2003.
- MENDONÇA, M. da C., SANTOS, M. da F., SILVA-MANN, R., FERREIRA, J. M. Rapd, microsatellites markers in the genetic diversity characterization of *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. Isolates. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 15, p. 117-124, 2012.
- MEYLING, N. V., EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, p. 145–155, 2007.
- NEUVÉGLISE, C., BRYGOO, Y. AND RIBA, G. 28S rDNA group I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 373–381, 1997.
- OULEVY, C., WIDMER, F., KÖLLIKER, R., ENKERLI, J. An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. **Mycological Research**, v.113(9), p. 1016-1024, 2009.

PIRES, A. P. D. DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM LINHAGENS DE *Beauveria bassiana*. Dissertação de Mestrado, Recife, UFPE, 2002.

REBER, A., CHAPUISAT, M. Diversity, prevalence and virulence of fungal entomopathogens in colonies of the ant *Formica selysi*. **Insectes Sociaux**, v. 59(2), p. 231-239, 2012.

ROBERTS, D. W., ST. LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. Advances in **Applied Microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

SEMAGN, K., BJORNSTAD, A., NDJIONDJOP, M. N. Na overview of molecular markers methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 2540-2568, 2006.

SNEATH, P. H. & SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco, 1973.

ST LEGER, R. J., ALLEE, L. L., MAY, R., STAPLES, R. C., ROBERTS, D. W. World-wide distribution of genetic variation among isolates *Beauveria* spp. **Mycology Research**, v. 96, p. 1007-1015, 1992.

VELÁSQUEZ, V. B., CÁRCAMO, M. P., MERIÑO, C. R., IGLESIAS, A. F., DURÁN, J. F. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**. V. 30, p. 89-99, 2007.

3. Conclusões Gerais

O número de isolados e gêneros de fungos entomopatogênicos encontrados nas diferentes regiões estudadas do estado de Sergipe sugere a ocorrência natural desses microrganismos nesse ambiente e uma visão da diversidade de fungos com potencial para ser usado no controle biológico de artrópode-praga. Os gêneros predominantes em solos das regiões estudadas foram *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*.

Considerando os fatores que influenciam a ocorrência dos entomopatógenos no ambiente, houveram isolados de fungos entomopatogênicos nas três regiões, sertão, agreste e leste, como nos dois períodos avaliados, seco e úmido. Assim esses isolados podem ser úteis em regiões com alta incidência de radiação UV e baixa umidade, características típicas do nordeste brasileiro. A ocorrência de fungos patogênicos a insetos também foi observada tanto em habitats naturais, quanto em habitats agrícolas. O fatores referente às características do solo, pH, quantidade de matéria orgânica e argila influencia na presença dos entomopatógenos, favorecendo alguns indivíduos a depender das condições.

Através da técnica molecular RAPD, a diversidade dos fungos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* foi investigada. Os isolados dos dois gêneros apresentaram vasta variabilidade genética, entretanto não foi observada uma correlação entre a origem dos isolados e a similaridade genética entre eles.

Torna-se necessário a continuação dos estudos a partir dos isolados obtidos o presente trabalho, estendendo o conhecimento sobre eles, a fim de possivelmente selecionar indivíduos promissores para o controle biológico de pragas compatíveis com as peculiaridades climáticas de Sergipe.

4. Referências Gerais

- ALVES, S. B., ALMEIDA, J. E. M., MOINO JR, A., ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. IN: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.20, p. 637-710.
- ALVES, S. B., LECUONA, R. E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. IN: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.05, p. 97-170.
- BAUMANN, R., SCHUBERT, R., HEITLAND, W., AUGER-ROZENBERG, A. A., FAIVRE-RIMPANT, P., MÜLLER-STARCK, G. Genetic diversity within and among populations of *Dipion pini* (Hym., Diprinidae) determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction of haploid males. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 258-264, 2003.
- BAYER, C., MIELNICZUK, J., Dinâmica e função da matéria. IN: SANTOS, G. A., SILVA, L. S., CANELLAS, L. P., CAMARGO, F. A. O. (Ed). **Fundamentos da matéria orgânicas: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008, p. 1-5.
- BERRETA, M. F.; LECUONA, R. E.; ZANDOMENI R. O.; & GRAU, O. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.145-150, 1998.
- BIDOCHKA, M. J., KAMP, A. M., LAVENDER, T. M., DEKONING, J., de CROOS, J. N. A. Habitat association in two genetic groups of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1335–1342, 2001.
- BIDOCHKA, M. J., MENZIES, F. V., KAMP, A. M. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. **Archives of Microbiology**, v. 178, p. 531–537, 2002.
- BIRKHOFER, K., BEZEMER, T. M., BLOEM, J., BONKOWSKI, M., CHRISTENSEN, S., DUBOIS, D., EKELUND, F., FLIESSBACH, A., GUNST, L., HEDLUND, K., MADER, P., MIKOLA, J., ROBIN, C., SETALA, H., TATIN-FROUX, F., VAN DER PUTTEN, W. H.,

SCHEU, S. Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: implications for soil quality, biological control and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2297–2308, 2008.

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

BRAGA, G. U. L., FLINT, S. D., MILLER, C. D., ANDERSON, A. J., ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium anisopliae* isolates from sites at latitudes from 61_N to 54_S. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 98–108, 2001.

CARNEIRO, A. A., GOMES, E. A., GUIMARÃES, C. T., FERNANDES, F. T., CARNEIRO, N. P., CRUZ, I. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, 2008.

CASTRILLO, L. A., VANDERBERG, J. D., WRAIGHT, S. P. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence characterized amplified region markers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, p. 75-83, 2003.

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

CROWDER, D. W., NORTHFIELD, T. D., STRAND, M. R., SNYDER, W. E. Organic agriculture promotes evenness and natural pest control. **Nature**, v. 466, p. 109–112, 2010.

DALLEAU-CLOUET, C., GAUTHIER, N., RISTERUCCI, A.-M., BON\$, M.-C., FARGUES, J. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 496-498, 2005.

DALZOTO, P. R., GLIENKE-BLANCO, C., KAVA-CORDEIRO, V., ARAÚJO, W. L., AZEVEDO, J. L. RAPD analyses of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria*. **Mycology Research**, v. 107, p. 1069-1074, 2003.

- DEVI, K. U., REINEKE, A., REDDY, N. N. R., RAO, C. U. M., PADMAVATHI, J. Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin. **Genome**, v. 49(5), p. 495(10), 2006.
- DOBERSKI, J.W., TRIBE, H.T. Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, p. 95–100, 1980.
- DRIVER, F., MILNER, R. J., TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycology Research**, v. 104, p. 143–150, 2000.
- ENKERLI, J., KÖLLIKER, R., KELLER, S., WIDMER, F. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 384-386, 2005.
- ESTEVE-ZARZOSO, B., BELLOCH, C., URUBURU, F., QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 329-337, 1999.
- FERNANDES, E. K. K., COSTA, G. L., MORAES, A. M. L., ZAHNER, V., BITTENCOURT, V. R. E. P. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of Beauveria bassiana isolates obtained from Boophilus microplus tick. **Parasitology Research**, v. 98, p. 324–332, 2006.
- FERNANDES, E. K. K., RANGEL, D. E. N., MORAES, A. M. L., BITTENCOURT, V. R. E. P., ROBERTS, D. W. Cold activity of Beauveria and Metarhizium, and thermotolerance of Beauveria. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 69–78, 2008.
- FERNANDES, E. K. K., MORAES, A. M. L., PACHECO, R. S., RANGEL, D. E. N., MILLER, M. P., BITTENCOURT, V. R. E. P., ROBERTS, D. W. Genetic diversity among Bazilian isolates of Beauveria bassiana: comparisons with non-Brazilian isolates and other Beauveria species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 760-774, 2009.
- FERNANDES, E. K. K., KEYSER, C. A., RANGEL D. E. N., FOSTER, R. N., ROBERTS, D. W. CTC medium: A novel dodeine-free selective medium for isolating entomopathogenic

fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, p. 197–205, 2010.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa Cenargen, 1995.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. Ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998.

FERRI, D., MUNHOZ, C., NEVES, P., FERRACIN, L., SARTORI, D., VIEIRA, M., FUNGARO, M. Genetic variability of *Beauveria bassiana* and a DNA markers for environmental monitoring of a highly virulent isolate against *Cosmopolites sordidus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52(4), p. 569-574, 2012.

FOTH, H. D. **Fundamentals of Soil Science**. John Wiley & Sons, London, 1984.

FRANCO, E. **Biogeografia do Estado de Sergipe**. 1983, Aracaju, p. 13-133.

FREED, S., JIN, F. L., REN, S. X. Phylogenetics of Entomopathogenic Fungi Isolated Paecilomyces spp. (Ascomycota) From the Soils of Different Ecosystems. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 43 (3). 2011.

FUKATSU, T., SATO, H., KURIYAMA, H. Isolation, Inoculation to Insect Host, and Molecular Phylogeny of an Entomogenous Fungus Paecilomyces tenuipes. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 70, p. 203-208, 1997.

GALÁN-FRANCO, L. A., MORALES-LOREDO, A., ALVARES-OJEDA, G., LÓPEZ-ARROYO, J. I., ARÉVALO-NIÑO, K., SANDOVAL-CORONADO, C., QUINTERO-ZAPATA, I. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from citrus-growing areas of Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 36(4), p. 443-449, 2011.

GARRIDO-JURADO, I., MÁRQUEZ, M., ORTIZ-URQUIZA, A., SANTIAGO-ÁLVAREZ, C., ITURRIAGA, E. A., QUESADA-MORAGA, E., MONTE, E., HERMOSA, R. Genetic analyses place most Spanish isolates of *Beauveria bassiana* in a molecular group with world-wide distribution. **BMC Microbiology**, v. 11:84, 2011.

GOBLE, T. A., DAMES, J. F., HILL, M. P., MOORE, S. D. The effects of farming system, habitat type and bait type on the isolation of entomopathogenic fungi from citrus soils in the Eastern Cape Province, South Africa. **BioControl**, v. 55, p. 399–412, 2010.

GOETTEL, M.S., INGLIS, G.D. Fungi: Hyphomycetes. IN: LACEY, L. A. (Ed.) **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic Press, San Diego, USA., 1997, pp. 213-249.

GULSAR BANU J., SUBAHASAN K., IYER R. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in white grub endemic areas of Kerala. **J Plant Crops**, v. 32, p. 333–334, 2004.

HUMBER, R.A. Fungi – Preservation. In: Lacey, L.A. (Ed.), **Biological Techniques in Invertebrate Pathology**. Academic Press, London. 1996.

HUMBER, R. A. Identification of entomopathogenic fungi. IN: LACEY, L. A. (Ed.) **Manual of Techniques in Invertrebate Pathology**, 2 ed. Academic Press, San Diego, 2012, cap. VI, p. 151-182.

HUMMEL, R. L., WALGENBACH, J. F., BARBERCHECK, M. E., KENNEDY, G. G., HOYT, G. D., ARELLANO, C. Effects of production practices on soil-borne entomopathogens in western North Carolina vegetable systems. **Environmental Entomology**, v. 31, p. 84–91, 2002.

INGLIS, G. D., GOETTEL, M. S., BUTT, T., STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insects pest. IN: BUTT, T. M., JACKSON, C. W., MAGAN, N. (Eds), **Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential**. CABI publishing, Wallingford, UK, 2001, p. 23-70.

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

INGLIS, G. D., ENKERLI, J., GOETTEL, M. S. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales IN: LACEY, L. A. (Ed.) **Manual of Techniques in Invertrebate Pathology**, 2 ed. Academic Press, San Diego, 2012, cap. VII, p. 189-251.

JABBOUR, R., CROWDER, D. W., AULTMAN, E. A., SNYDER, W. E. Entomopathogen biodiversity increases host mortality. **Biological Control**, v. 59, p. 277-283, 2011.

KELLER, S., ZIMMERMAN, G. Mycopathogens of soil insects. In: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. (Eds.), **Insect– Fungus Interactions**. London, UK: Academic Press, p. 240–270, 1989.

KIRK, J. L., BEAUDETTE, L. A., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIRONOMOS, J. N., LEE, H., TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

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

LIU, Z.Y., MILNER, R.J., MCRAE, C.F., LUTTON, G.G. The use of dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 248–251, 1993.

LOSEY, J. E., VAUGHAN, M. The economic value of ecological services provided by insects. **Bioscience**, v. 56, p. 311–323, 2006.

MACEDO, D. **Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar**. 2005. 85p.Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba.

MAGALHÃES, B. P., TIGANO, M.S., MARTINS, I., FRAZÃO, H., RAMIREZ, H. G. Characterization of a Peruvian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, a pathogen of grasshoppers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n.12, 2003.

McCAIG, A. E., GLOVER, L. A., PROSSER, J. I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 67, p. 4554-4559, 2001.

McCOY, C. W., STOREY, G. K., TIGANO-MILANI, M. S. Environmental factors affecting entomopathogenic fungi in the soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 107-111, 1992.

MEDO, J., CAGÁN, L. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, v. 59, p. 200-208, 2011.

MENDONÇA, M. da C., SANTOS, M. da F., SILVA-MANN, R., FERREIRA, J. M. Rapd, microsatellites markers in the genetic diversity characterization of *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. Isolates. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 15, p. 117-124, 2012.

MEYLING, N. V., EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 113, p. 336–341, 2006.

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

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

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

NEUVÉGLISE, C., BRYGOO, Y. AND RIBA, G. 28S rDNA group I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 373–381, 1997.

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

OSBORNÍK, M., KLÍC, M., ZIZCA, L. Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. **Canadian Journal of Botany**, v.78, p. 1150-1155, 2000.

OULEVEY, C., WIDMER, F., KÖLLIKER, R., ENKERLI, J. An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. **Mycological Research**, v.113(9), p. 1016-1024, 2009.

PIRES, A. P. D. DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM LINHAGENS DE *Beauveria bassiana*. Dissertação de Mestrado, Recife, UFPE, 2002.

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

RANGEL, D.E.N., DETTENMAIER, S.J., FERNANDES, E.K.K., ROBERTS, D.W. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, p. 375–389, 2010.

REAY, S. D., BROWNBRIDGE, M., CUMMINGS, N. J., NELSON, T. L., SOUFFRE, B., LIGNON, C., GLARE, T. R. Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand Pinus radiata plantation forests. **Biological Control**, v. 46(3), p. 484-494, 2008.

REBER, A., CHAPUISAT, M. Diversity, prevalence and virulence of fungal entomopathogens in colonies of the ant *Formica selysi*. **Insectes Sociaux**, v. 59(2), p. 231-239, 2012.

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

REHNER, S. A., MINNIS, A. M., SUNG, G., LUANGSA-ARD, J. J., DEVOTTO, L., HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycology**, v. 103(5), p. 1055–1073, 2011.

RIBEIRO, A. C., GUIMARÃES, P. T. G., ALVAREZ V., V. A. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais.** Viçosa, MG, 1999, p. 359.

ROBERTS, D. W., ST. LEGER, R. J. *Metarhizium spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects.* Advances in **Applied Microbiology**, v. 54, p. 1–70, 2004.

SACCARO JR, N. L. **Desafios da bioprospecção no Brasil.** Instituto de Pesquisa Econômica e Aplicada. Brasília, Jan, 2011.

SANCHÉZ-PEÑA, S. R., LARA, J. S. J., MEDINA, R. F. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. **Journal of Insect Science**, v. 11:1, 2011.

SANTOS, M. P., DIAS, L. P., FERREIRA, P. C., PASIN, L. A. A. P., RANGEL, D. E. N. Cold activity and tolerance of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium* spp. to UV-B irradiation and heat. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 209–213, 2011.

SEMAGN, K., BJORNSTAD, A., NDJIONDJOP, M. N. Na overview of molecular markers methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 2540-2568, 2006.

SEVİM, A., DEMİR, I., HÖFTEM, M., HUMBER, R. A., DEMIRBAG, Z. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. **BioControl**, v. 55, p. 279-297. 2010.

SOBRAL, L. F., VIEGAS, P. R. A., SIQUEIRA, O. J. W., ANJOS, J. L., BARRETTO, M. C. V., GOMES, J. B. V. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes no Estado de Sergipe.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007, p. 251.

SNEATH, P. H. & SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy.** Freeman, San Francisco, 1973.

SOSA-GÓMEZ, D. R., TIGANO, M. S., ARANTES, O. M. N. Caracterização de entomopatógenos. IN: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap 22, p. 731-758.

STANDING, D., KILLHAM, K. The soil environment. IN: VAN ELSAS, J. D., JANSSON, J., TREVORS, J. T. (2 ed). **Modern Soil Microbiology.** CRC: Taylor & Francis Group LLC, 2007, p. 1-22.

STEENBERG, T., 1995. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with focus on infectivity to *Sitona* species and other insects in lucerne. Tese de Ph.D. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.

ST LEGER, R. J., ALLEE, L. L., MAY, R., STAPLES, R. C., ROBERTS, D. W. World-wide distribution of genetic variation among isolates Beauveria spp. **Mycology Research**, v. 96, p. 1007-1015, 1992.

STOREY, G. K., GARDNER, W. A. Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through four Georgia soil types. **Environmental Entomology**, v. 16, p. 178-181, 1987.

VAN DER PUTTEN, W. H., BARDGETT, R. D., DE RUITER, P. C., HOL, W. H. G., MEYER, K. M., BEZEMER, T. M., BRADFORD, M. A., CHRISTENSEN, S., EPPINGA, M. B., FUKAMI, T., HEMERIK, L., MOLOFSKY, J., SCHADLER, M., SCHERBER, C., STRAUSS, S. Y., VOS, M., WARDLE, D. A. Empirical and theoretical challenges in aboveground–belowground ecology. **Oecologia**, v. 161, p. 1–14, 2009.

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

VELÁSQUEZ, V. B., CÁRCAMO, M. P., MERINÓ, C .R., IGLESIAS, A. F., DURÁN, J. F. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae var. anisopliae as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p. 89-99, 2007.