

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAMIRES DOROTEO DE SOUZA

DIVERSIDADE GENÉTICA DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium rileyi* E INFLUÊNCIA DO FILOPLANO DA SOJA E DO ALGODÃO SOBRE O PROCESSO DE INFECÇÃO EM *Chrysodeixis includens* E *Helicoverpa armigera*

CURITIBA

2024

TAMIRES DOROTEO DE SOUZA

DIVERSIDADE GENÉTICA DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium rileyi* E INFLUÊNCIA DO FILOPLANO DA SOJA E DO ALGODÃO SOBRE O PROCESSO DE INFECÇÃO EM *Chrysodeixis includens* E *Helicoverpa armigera*

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Coorientador: Dra. Sara Mataroli de Godoy

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Souza, Tamires Doroteo de

Diversidade genética do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* e influência do filoplano da soja e do algodão sobre o processo de infecção em *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera* / Tamires Doroteo de Souza. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez.

Coorientadora: Dra. Sara Mataroli de Godoy.

1. Genética de populações. 2. Lepidoptero. 3. Cromatografia. 4. Lagartas. 5. Algodão. 6. Soja. I. Sosa-Gomez, Daniel Ricardo. II. Godoy, Sara Mataroli. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Entomologia). IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) - 40001016005P5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

(ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **TAMIRES DOROTEO DE SOUZA** intitulada: **Diversidade genética do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* e influência do filoplano da soja e do algodão sobre o processo de infecção em *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*.**, sob orientação do Prof. Dr. DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Abril de 2024.

Assinatura Eletrônica
22/04/2024 17:27:05.0
DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
24/04/2024 12:11:17.0
MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
03/05/2024 17:05:09.0
MARCOS RODRIGUES DE FARIA
Avaliador Externo (EMBRAPA)

Assinatura Eletrônica
22/04/2024 17:15:03.0
ITALO DELALIBERA JUNIOR
Avaliador Externo (UNIV.DE SÃO PAULO/ESCOLA SUP. DE
AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ)

Departamento de Zoologia - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná – Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1763 - E-mail: pgento@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 359745

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 359745

"A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez".
(George Bernard Shaw)"

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos aqueles que contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho e para o cumprimento desta jornada acadêmica. Primeiramente, sou imensamente grata a Deus, por ter me dado força e sabedoria nesta jornada, vem dele tudo que sou o que tenho e o que espero. Aos meus orientadores Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez e Dra. Sara Mataroli de Godoy cujo apoio, paciência e orientação foram essenciais ao longo de todo o desenvolvimento desta tese. A dedicação e compromisso de vocês com a excelência acadêmica foram fundamentais para o meu crescimento como pesquisadora. Agradeço a Embrapa Soja e a Universidade Federal do Paraná, por proporcionar o ambiente acadêmico propício ao desenvolvimento deste estudo. Agradeço também a todos os colegas e amigos que compartilharam conhecimento, experiências e momentos ao longo dessa jornada. Aos meus familiares, em especial minha mãe, pai e meus irmãos, pelo amor incondicional, apoio emocional e compreensão durante todo o percurso desta tese. Vocês foram o alicerce que me sustentou nos momentos mais desafiadores. Agradeço aos financiadores e instituições que apoiaram esta pesquisa, seja por meio de bolsas de estudo, recursos financeiros ou equipamentos, tornando possível a realização deste trabalho. Não posso deixar de mencionar a todos os participantes e colaboradores que se dispuseram a contribuir para a coleta de dados e informações essenciais para a condução deste estudo. José Jairo da Silva, Jovenil José da Silva, Oriverton Tonon, Adriano dos Santos, Jaciara Gonçalves, Daniele Cassiano Feliciano, Nicolay Marino Nicolau, Anna Cristina Wilcken Félix Pessoa, Ana Paula Queiroz, Alini de Almeida, Maria Cristina Neves de Oliveira e Guilherme Zocolo. Por fim, dedico meus agradecimentos especiais à minha fonte de inspiração e força, Antonio Alves, cujo apoio incondicional e incentivo foram fundamentais para alcançar este importante marco em minha trajetória acadêmica.

A todos, o meu mais profundo agradecimento por fazerem parte desta caminhada e por terem tornado possível a realização deste sonho. Suas contribuições foram inestimáveis e deixaram uma marca indelével nesta tese de doutorado.

Muito obrigada!

RESUMO

As culturas da soja e do algodão são alvos das lagartas *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*, além dessas espécies essas culturas também podem sofrer danos ocasionado por outras lagartas. Portanto, o desenvolvimento de bioinseticidas, à base de fungos entomopatogênicos, pode propiciar o controle dessas pragas com sustentabilidade. Entre os fungos causadores de doenças em lepidópteros, o fungo *Metarhizium rileyi* se destaca por apresentar alto potencial de controle, uma vez que suas epizootias dizimam as populações de lagartas. O presente trabalho foi fundamentado em três aspectos: identificação adequada de isolados (para esta finalidade foram utilizados marcadores moleculares microssatélites, até o presente, inéditos para a espécie), verificar a ocorrência de limitações impostas pelos exsudatos foliares, efeito da microtopografia das plantas alvo sobre o agente de controle e a seleção de isolados promissores considerado o substrato alimentar da praga. O desconhecimento sobre a contribuição e o comportamento de diferentes isolados durante essas epizootias levanta questões essenciais, como a diversidade genética durante as epizootias e a identificação dos genótipos predominantes. Primers SSR foram desenhados por meio de prospecção *in silico* para discriminar genótipos e inferir a diversidade genética de isolados de *M. rileyi* provenientes da coleção mantida na Embrapa Soja. Foram testados 13 marcadores SSR em 136 isolados, identificando 43 clones e 12 clusters genéticos diferentes, com diversidade genética variando de $H_s = 0,15$ a $H_s = 0,41$ e uma diversidade média de 0,24. Nenhum cluster foi distinguido categoricamente com base no hospedeiro ou origem geográfica, no entanto, os isolados analisados mostraram evidências de estrutura clonal. Além disso, a investigação das interações entre dez isolados de *M. rileyi* e folhas de algodão e soja, revelou a existência de variações na fixação dos conídios e nas taxas de germinação, influenciadas pela polaridade dos solventes utilizados na obtenção dos extratos epicuticulares das espécies vegetais. Os extratos das folhas de algodão e soja obtidos com solventes apolares apresentaram maior aderência de conídios em comparação os extratos obtidos com os solventes polares. A microtopografia das folhas, examinada por microscopia eletrônica de varredura, revelou uma distribuição mais uniforme de conídios na superfície de folhas de algodão, enquanto nas folhas de soja os conídios tendiam a formar agregados. Após a análise química dos extratos obtidos das folhas de algodão e soja, foi possível identificar substâncias como o β -Amyrin e o D-Mannitol, que são compostos presentes com maior intensidade no algodão e quase inexistentes na soja. Outras substâncias são encontradas no algodão como Lanosta-8,24-Dien-3-one, assim como, o D-Pinitol, β -Fructofuranose, Ribitol e ácido Butanóico. Essas diferenças de substâncias encontradas nos extratos aparentemente influenciaram o comportamento de *M. rileyi* na fixação e germinação. Empregando a estimativa de Kaplan-Meier para analisar a sobrevivência das lagartas expostas aos isolados de *M. rileyi* nos diferentes substratos alimentares, resultou que o isolado Mr27 se destacou na redução da sobrevivência das lagartas em diversos substratos, sendo mais eficaz em folhas de algodão. A análise comparativa entre as espécies de lagartas e os substratos, ressalta a influência significativa que pode apresentar a cultura sobre a qual se aplica controle microbiano com *M. rileyi*. Este estudo contribui para uma compreensão mais aprofundada das interações tritróficas, sugerindo que é crucial considerar todas as três premissas na seleção de isolados para o desenvolvimento de bioinseticidas mais eficazes no MIP em diferentes contextos agrícolas.

Palavras-chave: SSR, Genética de população, Superfície foliar, Cromatografia, Lepidoptera.

ABSTRACT

The soybean and cotton crops are targets of the caterpillars *Chrysodeixis includens* and *Helicoverpa armigera*, and besides these species, these crops can also suffer damage caused by other caterpillars. Therefore, the development of bioinsecticides based on entomopathogenic fungi can provide sustainable control of these pests. Among the fungi causing diseases in lepidopterans, the fungus *Metarhizium rileyi* stands out for its high control potential, as its epizootics decimate caterpillar populations. This study was based on three aspects: proper identification of isolates (for this purpose, molecular markers such as microsatellites, hitherto unpublished in the scientific literature, were used), verification of limitations imposed by foliar exudates, the effect of microtopography of target plants on the control agent, and the selection of promising isolates considering the pest's food substrate. The lack of knowledge about the contribution and behavior of different isolates during these epizootics raises essential questions, such as genetic diversity during epizootics and the identification of predominant genotypes. SSR primers were designed through *in silico* prospecting to discriminate genotypes and infer the genetic diversity of *M. rileyi* isolates from the collection maintained at Embrapa Soybean. Thirteen SSR markers were tested on 136 isolates, identifying 43 clones and 12 different genetic clusters, with genetic diversity ranging from $H_s = 0.15$ to $H_s = 0.41$ and an average diversity of 0.24. No cluster was categorically distinguished based on host or geographical origin; however, the analyzed isolates showed evidence of clonal structure. Furthermore, the investigation of interactions between ten isolates of *M. rileyi*, cotton, and soybean leaves revealed variations in conidial attachment and germination rates, influenced by the polarity of the solvents used in obtaining the epicuticular extracts of the plant species. Extracts from cotton and soybean leaves obtained with apolar solvents showed greater conidial adhesion compared to extracts obtained with polar solvents. Leaf microtopography, examined by scanning electron microscopy, revealed a more uniform distribution of conidia on cotton leaves, while on soybean leaves, conidia tended to form aggregates. After chemical analysis of the extracts obtained from cotton and soybean leaves, substances such as β -Amyrin and D-Mannitol were identified, which are compounds present more intensely in cotton and almost nonexistent in soybean. Other substances found in cotton include Lanosta-8,24-Dien-3-one, as well as D-Pinitol, β -Fructofuranose, Ribitol, and Butanoic acid. These differences in substances found in the extracts apparently influenced the behavior of *M. rileyi* in attachment and germination. Employing Kaplan-Meier estimation to analyze the survival of caterpillars exposed to *M. rileyi* isolates on different food substrates resulted in the isolate Mr27 standing out in reducing caterpillar survival in various substrates, being more effective on cotton leaves. The comparative analysis between caterpillar species and substrates highlights the significant influence that the crop on which microbial control with *M. rileyi* is applied can present. This study contributes to a deeper understanding of tritrophic interactions, suggesting that it is crucial to consider all three premises in the selection of isolates for the development of more effective bioinsecticides in IPM in different agricultural contexts.

Keywords: SSR, Population genetics, Leaf surface, Chromatography, Lepidoptera.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA	10
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	10
1.2 OBJETIVOS	13
1.2.1 Objetivo Geral.....	13
1.2.2 Objetivos Específicos.....	13
1.3. REVISÃO DE LITERATURA	14
1.3.1. Culturas de soja e algodão.....	14
1.3.2. <i>Chrysodeixis includens</i> (Walker, 1857)	14
1.3.3. <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner).....	15
1.3.4. Características gerais de <i>Metarhizium rileyi</i>	16
1.3.5. Virulência de fungos entomopatogênicos no contexto tritrófico	17
1.3.6. Marcadores moleculares: uma ênfase nos microssatélites	20
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2. DIVERSIDADE GENÉTICA DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>Metarhizium rileyi</i> COM BASE EM MARCADORES MICROSATÉLITES	29
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1. Origens dos isolados	32
2.2. Prospecção <i>in silico</i> e desenvolvimento de primers microssatélites	33
2.3. Extração e quantificação de DNA	41
2.4. Amplificação de regiões SSR.....	41
2.5. Amplificação da região da calmodulina.....	44
2.6. Análise de dados SSR	45
3. RESULTADOS	46
3.1. Caracterização de loci microssatélites.....	46
3.2. Diversidade e estrutura genética	47
3.3. Diversidade de um fragmento do gene da calmodulina de <i>M. rileyi</i>	52
4. DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56

CAPÍTULO 3. A PLANTA HOSPEDEIRA INFLUÊNCIA A VIRULÊNCIA DO FUNGO	
<i>Metarhizium rileyi</i> ?	61
1. INTRODUÇÃO	63
1. MATERIAL E METODOS	64
2.1. Criação massal de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Helicoverpa armigera</i>	64
2.2. Obtenção do fungo entomopatogênico	65
2.3. Plantas hospedeiras	65
2.4. Bioensaios	65
2.5. Análise de sobrevivência	66
2.6. Análise estatística	66
3. RESULTADOS	67
3.1. Sobrevivência das lagartas de <i>C. includens</i> alimentadas com diferentes substratos e a virulência dos isolados de <i>M. rileyi</i>	67
3.2. Sobrevivência das lagartas de <i>H. armigera</i> alimentadas com diferentes substratos e a virulência dos isolados de <i>M. rileyi</i>	69
4. DISCUSSÃO	71
5. CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
CAPÍTULO 4. INFLUÊNCIA NA FIXAÇÃO E GERMINAÇÃO DE <i>Metarhizium rileyi</i> NAS SUPERFÍCIES FOLIARES DE ALGODÃO E SOJA: UMA VISÃO DAS INTERAÇÕES FUNGOS-PLANTAS	78
1. INTRODUÇÃO	80
2. MATERIAL E METODOS	81
2.1. Isolados de <i>Metarhizium rileyi</i>	81
2.2. Fixação e persistência do fungo em folhas de algodão e soja	81
2.3. Extratos foliares	82
2.4. Ensaios de fixação e germinação de conídios em extratos epicuticulares	82
2.5. Extração e derivatização	83
2.6. Análise Cromatográfica GC-MS	84
2.7. Análise Estatística	84
3. RESULTADOS	85

3.1. Fixação de conídios de <i>Metarhizium rileyi</i> em extratos epicuticulares de folhas de algodão e soja	85
3.2. Germinação de <i>Metarhizium rileyi</i> em compostos extraídos de folhas de algodão e folíolos de soja.	88
4. DISCUSSÃO	96
5. CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	101

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura no Brasil é uma das principais bases da economia do país. Entre as espécies cultivadas em todo território, destacam-se, a soja (*Glycine max* L.) e o algodão (*Gossypium hirsutum* L.). A expansão das áreas de cultivo dessas culturas tem contribuído com a elevação do Brasil no ranking mundial, sendo o maior produtor de soja e o quarto maior de algodão (Conab, 2023). Entretanto, a produtividade dessas culturas frequentemente é ameaçada por lagartas da família Noctuidae, insetos capazes de causar grandes prejuízos desde a germinação à colheita. Dentre as pragas pertencente a essa família, duas importantes espécies de lagartas desfolhadoras merecem destaque, como, *Chrysodeixis includens* (Walker) e *Helicoverpa armigera* (Hübner).

Chrysodeixis includens possui uma ampla gama de hospedeiros, entre eles a soja e o algodão, as lagartas dessa espécie se alimentam do parênquima das folhas, dando as folhas um aspecto rendilhado (Bueno et al., 2009). No Brasil se tornou uma das principais pragas na soja, provavelmente devido ao uso excessivo de fungicidas para controlar a ferrugem asiática, o que acabou reduzindo os inimigos naturais que mantinha a densidade da população abaixo do nível de dano (Sosa-Gómez; Lastra; Humber, 2010).

Helicoverpa armigera, também é citada como uma das mais importantes pragas, cujo surto durante a safra 2012/13 no Brasil, acarretou severos danos (Sosa-Gómez et al., 2016). A principal forma de controle dessas duas espécies é baseada na utilização agentes químicos (Ávila; Vivan; Tomqueslki, 2013) e o uso têm acelerado o desenvolvimento de resistência de insetos pragas e reduzido a população de inimigos naturais, tornando-se uma grande preocupação ambiental (Ahmad et al., 2003; Wu, 2007; Durigan et al., 2017). A busca por medidas alternativas que visam diminuir esses impactos adquiriu especial relevância. Por essa razão, o uso de agentes de controle biológico aliado com o controle microbiano de insetos é considerado uma opção eficiente e segura, especialmente o uso de microrganismos entomopatogênicos, como os fungos.

Metarhizium rileyi é uma espécie cosmopolita de fungo entomopatogênico da família Clavicipitaceae (Hypocreales, Ascomycota), que apresenta um espectro de ação limitado a diversas espécies de lepidópteros pragas (Binneck et al., 2019) e têm potencial para ser utilizado como agente no biocontrole de pragas chaves como *C. includens* e *H.*

armigera. Devido a ampla distribuição geográfica e variabilidade genética intraespecífica (Goettel et al. 2010), *M. rileyi* possibilita o estudo de seleção de isolados que apresentem alta virulência e maior persistência, possibilitando assim melhorar a eficiência em campo para o controle de determinado inseto-praga. Por exemplo, isolados de *M. rileyi* originários de *Spodoptera frugiperda* foram mais virulentos para *S. frugiperda* do que *M. rileyi* isolado de *Anticarsia gemmatalis* (Tigano-Milani et al., 1995). Da mesma forma, foi observada especificidade entre três isolados de *M. rileyi* obtidos de diferentes espécies *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *Chrysodeixis includens* no sul do Brasil (Moscardi et al., 1997).

Os isolados de *M. rileyi* que apresentam diferentes níveis de virulência possuem propriedades morfológicas e de crescimento in vitro semelhantes (Boucias et al., 2000; Licona-Juarez et al., 2023). A fim de compreender melhor as relações patógeno-hospedeiro desta espécie de fungo, vários métodos moleculares foram utilizados para diferenciar isolados de *M. rileyi*. Técnicas como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Tigano & Aljanabi, 2000) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Boucias et al., 2000a, Boucias et al., 2000b) demonstraram que os polimorfismos genéticos observados entre os isolados de *M. rileyi* estavam associados à localização geográfica. Por exemplo, os isolados sul-americanos foram separados da maioria dos isolados norte-americanos através de dados provenientes de marcadores AFLP (Boucias et al., 2000b).

Em contrapartida, estudos com outras técnicas moleculares (RAPD) demonstraram que os isolados dessa espécie se agrupavam por semelhança em dois grupos associados a hospedeiros diferentes (Tigano & Aljanabi, 2000). Além dos marcadores citados, os marcadores microssatélites ou repetição de sequência simples (SSR) têm facilitado a compreensão da base genética de muitos organismos, devido à sua reprodutibilidade, rapidez da técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo de utilização e grande poder de resolução (Boiko, 2022). Em fungos, os marcadores SSR são eficientemente utilizados em estimativas de diversidade genética, confirmação da identidade de cepas, identificação da origem geográfica das espécies, compreensão da estrutura genética de isolados, e caracterização de espécies e cepas, entre outras (Manawasinghe et al., 2018, Alloosh et al., 2019, Saleh et al., 2021, Xiong et al., 2021, Boiko, 2022)

Estudos que utilizaram marcadores do tipo microssatélites para diferenciar isolados de *Metarhizium* spp. (Kepler et al., 2015; Steinwender et al., 2011) demonstraram a

eficiência na técnica, podendo assim, ser considerada uma ferramenta eficaz para estudos de diferenciação de isolados. Diante da capacidade de *M. rileyi* em controlar o crescimento de populações de alguns lepidópteros praga e do potencial de aplicabilidade em técnicas de manejo, estudos moleculares aplicados a esta espécie se fazem imprescindíveis para a caracterização genética e compreensão das relações entre os diferentes genótipos no processo epizootiológico.

Além da diferenciação genética ser imprescindível o esclarecimento sobre todo o processo de infecção desse agente é de suma importância para maior aplicabilidade do patógeno nos programas de controle biológico, pois, a eficácia desses agentes depende em grande parte da virulência, da capacidade de germinar e da persistência do inóculo sobre a superfície da planta hospedeira do alvo de controle.

As interações patógeno-hospedeiro incluem adesão conidial, penetração do tegumento, proliferação no hemocele, morte e fase reprodutiva (Alves, 1998). Várias espécies de fungos são importantes agentes de controle de insetos-praga por causarem doenças epizoóticas (Sosa-Gómez et al. 2010). No entanto, o efeito na planta hospedeira na expressão de doenças epizoóticas não é bem conhecido. A influência da planta hospedeira no processo de infecção pode estar ligada à fixação e velocidade da germinação conidial (Sosa-Gómez, 2012), portanto, o entendimento dos fatores que influenciam a eficiência de infecção desse entomopatógeno é de vital importância para garantir o sucesso do controle. As lagartas desfolhadoras podem entrar em contato com o inóculo do fungo quando movimentam-se sobre o substrato que recebeu a dose do patógeno, assim, verificar as interações planta hospedeira/fungo, se torna crucial.

Como parte dessa interação a composição química e a estrutura física da superfície foliar pode influenciar na aquisição do conídio, afetando a germinação ou inibindo a virulência do fungo. Compostos epicuticulares, sejam eles presentes na superfície ou liberados por extravasamento dos conteúdos celulares podem reduzir a infecção (Inyang, 1999). A cera epicuticular apresenta um importante papel durante o processo de aderência dos fungos nas plantas. Estudos realizados por Marois et al. (1986), Skoropad e Tewari (1977) e Roderick e Thomas (1997) mostraram, a importância da cera como barreira física na ação dos fungos para com os seus hospedeiros.

Considerando que há pouco conhecimento sobre o impacto desses elementos nos fungos entomopatogênicos e a influência no controle de pragas agrícolas, estudos que explorem a diversidade genética do fungo e o efeito dos compostos epicuticulares presentes nas folhas da soja e do algodão na germinação e fixação dos conídios de *M.*

rileyi, bem como na virulência contra lagartas de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*, são relevantes para compreender o processo infeccioso.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética do fungo *M. rileyi* e a interação da espécie com compostos epicuticulares presentes nas folhas da soja e do algodão, bem como sua virulência em lagartas de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Prospectar *in silico*, desenhar e validar primers microssatélites para *M. rileyi*.
- Avaliar a diversidade genética de isolados coletados em diferentes hospedeiros e regiões geográficas.
- Elucidar a composição química dos compostos lixiviados das folhas de algodão e soja sobre o efeito na germinação e fixação de *M. rileyi*.
- Verificar a influência do substrato alimentar na virulência de *M. rileyi* em lagartas de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*.

1.3. REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1. Culturas de soja e algodão

O cultivo da soja (*Glycine max* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) no Brasil desempenha um papel de destaque na agricultura, sendo uma das principais commodities do país, tamanha relevância dessas culturas de deve à versatilidade dos produtos e subprodutos oriundos das mesmas. A soja compõe parte da nutrição humana e de animais e servem como base para produção de biocombustíveis (Cepea, 2022). O algodão, empregado na indústria têxtil, também se destaca no agronegócio nacional, cuja produção coloca ao país como quarto produtor e segundo principal exportador mundial da fibra (Abrapa, 2022).

Apesar da versatilidade e produtividade os agricultores dessas culturas enfrentam inúmeros desafios para manter a elevada eficiência que nos confere destaque no panorama agrícola internacional. Indubitavelmente, o ataque de pragas representa um desafio contínuo. A incidência de lagartas, percevejos, pulgões, entre outros insetos, bem como microrganismos fitopatogênicos, podem resultar em substanciais prejuízos à produção (Embrapa, 2022). Com o objetivo de minimizar esses ataques de pragas, táticas do manejo integrado de pragas vem se destacando, como a utilização de produtos à base de fungos entomopatogênicos (Michereff, 2009).

Um exemplar notável a ser mencionado é a ocorrência de epizootias do fungo *M. rileyi* nessas culturas (Ignoffo et al., 1976; Sosa-Gómez et al., 2003). Os benefícios da ação epizootica desse fungo consiste em promover o controle natural em lagartas como *Anticarsia gemmatalis*, *Trichoplusia ni*, *Helicoverpa armigera* e *Chrysodeixis includens*, importantes pragas da cultura de soja (Kogan et al., 1977; Ignoffo et al., 1976; Moscardi et al. 2012) e *Alabama argillacea* e *Chloridea virescens* no algodão (Jin et al., 1978; Costa et al., 2015).

1.3.2. *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857)

Até meados de 2003/2004, a ocorrência de *C. includens* era considerada limitada, sendo naturalmente controlada por parasitoides, predadores e entomopatógenos, raramente necessitando de intervenções para evitar prejuízos. A importância dessa praga cresceu nos últimos anos devido a surtos populacionais frequentes, provavelmente relacionados a mudanças no manejo agrícola para aumentar a produtividade, resultando

na redução de seus inimigos naturais (Sosa-Gómez et al., 2003; Sosa-Gómez; Lastra; Humber, 2010).

Essa espécie é considerada uma praga polífaga com relevância econômica em diversas culturas, registrada se alimentando de mais de 170 plantas hospedeiras (Specht; Paula-Moraes; Sosa-Gómez, 2015). Com distribuição restrita ao continente americano, abrangendo do norte dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (Alford, Hammond, 1982; Moscardi et al., 2012). O pico populacional da *C. includens* está associado à maior disponibilidade de plantas hospedeiras e a períodos quentes e úmidos (Santos et al., 2017), podendo permanecer em hospedeiros alternativos durante a entressafra. Além disso, observou-se que o aumento populacional de *C. includens* é comum quando o cultivo de soja é próximo a áreas de algodão (Burleigh, 1972), possivelmente explicado pelo consumo de néctar de flores de algodão pelos adultos, favorecendo a oviposição (Burleigh, 1972). A migração dos adultos desta espécie no Brasil pode ser favorecida pelo avanço das plantações de soja de Mato Grosso para outros estados (Palma et al., 2015).

Chrysodeixis includens tem a distribuição concentrada principalmente no terço inferior e área central das plantas de soja e algodão, o que torna desafiador o controle (Baldin, 2020). Elas se alimentam do limbo foliar, deixando as nervuras intactas, conferindo às folhas uma aparência rendilhada (Bueno et al., 2009; Moscardi et al., 2012). Como consequência, a área foliar pode sofrer uma redução significativa, impactando a produtividade das culturas, *C. includens* pode ocorrer tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva, tanto na cultura da soja quanto na cultura do algodão.

1.3.3. *Helicoverpa armigera* (Hübner)

Esta espécie é reconhecida como uma das principais pragas globalmente, devido à elevada capacidade de dispersão, taxa de reprodução acentuada, polifagia e capacidade de diapausa em latitudes mais altas (Fitt, 1989; Sosa-Gómez et al., 2016). No Brasil, a presença dessa praga foi inicialmente relatada em março de 2013, quando os espécimes foram coletados nos estados da Bahia, Mato Grosso, Paraná, Goiás e no Distrito Federal, causando danos significativos em plantações de soja e algodão (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013). Entretanto, estudos subsequentes confirmaram que a introdução da praga no país, provavelmente ocorreu em outubro de 2008, e até agosto de 2012, a espécie já estava distribuída desde o extremo sul até o norte do país (Sosa-Gómez et al., 2016).

Helicoverpa armigera demonstra uma notável capacidade de se desenvolver em uma variedade de hospedeiros, sendo registrada em mais de 100 espécies, incluindo

plantas das famílias Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (Fitt, 1989). As lagartas se alimentam de órgãos reprodutivos, resultando em uma perda anual que ultrapassa 2 bilhões de dólares apenas na região dos trópicos semiáridos da Europa (Sharma et al., 2012).

A notável capacidade da *H. armigera* em causar danos em culturas de importância econômica resultou em perdas de até 80% na produção da cultura do algodão durante a safra de 2011/2012 na região oeste da Bahia. O primeiro surto dessa praga na cultura da soja, ocorrido em 2012/2013, resultou em prejuízos superiores a \$ 2 bilhões (Sharma et al., 2012). Durante a fase larval, a *H. armigera* demonstra preferência por estruturas reprodutivas, como botões florais, vagens e grãos, embora também se alimente de folhas e hastes das plantas (Bortolotto et al., 2014). Os danos à soja começam desde a emergência da planta, quando as lagartas cortam as plantas abaixo dos cotilédones. A partir do estágio V3 da cultura, a lagarta assume um comportamento desfolhador, atacando o broto terminal. Estudos sobre o desenvolvimento das lagartas de *H. armigera* em soja concluíram que, ao atingirem o quarto instar, elas preferem folhas mais antigas e grãos bem desenvolvidos (Suzana et al., 2018).

1.3.4. Características gerais de *Metarhizium rileyi*

Metarhizium rileyi (Farlow) Kepler, SA Rehner e Humber, é um fungo cosmopolita que infecta lepidópteros das famílias Arctiidae, Erebidae e Noctuidae. Os lepidópteros de importância agrícola mais comuns infectados são da família Noctuidae que incluem *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797), *S. cosmioides* (Walker, 1858), *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805), *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803), *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852), *C. includens* (Walker, 1858), *Mythimna (Pseudaletia) sequax* (Franclemont, 1951), da Família Erebidae, *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 e *Alabama argillacea* (Hubner), (Fronza et al., 2017; Barros et al., 2020), e da família Arctiidae, *Spilosoma virginica* (Sosa-Gómez et al., 2010).

O fungo apresenta crescimento dimórfico ubíquo, com corpos hifais que se assemelham a leveduras na fase inicial de crescimento vegetativo e posteriormente formam um micélio filamentosso esbranquiçado do qual, na presença de umidade, surgem conidióforos que produzem conídios esverdeados (Boucias et al., 2000a). A classificação de *M. rileyi* sofreu muitas alterações, inicialmente denominada *Botrytis rileyi* Farl. 1883 (Farlow, 1883), seguido por *Spicaria rileyi* (Charles, 1936) e depois *Nomuraea rileyi* (Kish et al., 1974). Este último nome foi utilizado por um longo período de 40 anos, até

2014. Após análise filogenética multigênica, Kepler et al., 2014 sugeriram que o nome *Nomuraea rileyi* deveria ser atribuído ao gênero *Metarhizium*, devido à sua proximidade com *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) e *M. flavoviridae* (Gams & Rozsypal).

No Brasil, vários isolados de *M. rileyi* foram depositados em coleções, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), especialmente na Embrapa Soja e no Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN). Sendo, a grande maioria destes isolados obtido de apenas algumas espécies hospedeiras, especialmente *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* (Humber et al., 2011; Sosa-Gómez & Silva, 2002). Quando comparados com outras espécies de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *M. anisopliae*, *M. rileyi* é relativamente pouco estudado (Souza et al., 2022), pois, apresenta instabilidade na capacidade de produzir conídios devido às suas rigorosas exigências nutricionais, como a necessidade de Neopeptona de alta qualidade, o que reflete em alto custo de produção e reduz o número de estudos envolvendo o patógeno (Edelstein et al., 2004).

Apesar das dificuldades de conduzir estudos com o *M. rileyi*, os pequenos avanços na pesquisa contribuíram para algum conhecimento atual sobre esse patógeno e como ele interage com seus insetos hospedeiros. Ainda assim, mais pesquisas são necessárias para esclarecer pontos ainda desconhecidos, como por exemplo, os mecanismos envolvidos com a capacidade da espécie de infectar diferentes hospedeiros, os quais proporcionam diferentes qualidades nutricionais, a diversidade genética de *M. rileyi* e a seleção de isolados promissores pode contribuir para aumentar a eficácia contra diferentes Lepidópteros pragas (Fronza et al., 2017).

1.3.5. Virulência de fungos entomopatogênicos no contexto tritrófico

As plantas exercem influência considerável no desenvolvimento dos insetos herbívoros, afetando diretamente a taxa de crescimento populacional e, adicionalmente, promovendo impactos significativos sobre os inimigos naturais desses insetos (Inbar & Gerling, 2008; Johnson, 2009). As respostas das plantas à herbivoria dos insetos, podem ser variadas incluindo a liberação de substâncias voláteis que atraem os inimigos naturais dos insetos, muitas vezes em reação aos danos causados por espécies específicas de herbívoros. Tais sinais voláteis não apenas influenciam os inimigos naturais imediatos, mas também exercem efeitos sobre plantas vizinhas não afetadas, conforme destacado por Arimura et al., (2009). Embora grande parte da pesquisa sobre as respostas das plantas

aos danos tenha se concentrado nas interações entre pragas e parasitoides (DeMoraes et al. 1998; Gols & Harvey, 2009), evidências crescentes indicam que os efeitos mediados pelas plantas também desempenham um papel significativo no impacto sobre os entomopatógenos (Cory & Hoover, 2006).

Normalmente, esses fungos são aplicados através de pulverizações inundativa para suprimir o controle de pragas em um curto prazo (Inglis et al., 2001). No entanto, é crucial reconhecer que existe a possibilidade em que o fungo apresente um potencial de multiplicação, persistência e dispersão passiva, sugerindo que eles também possam proporcionar um controle eficaz a longo prazo (Hajek, 1997). Além disso, esses fungos são comuns na natureza e desempenham um papel significativo no controle natural em determinados grupos de insetos (Hajek, 1999), e, portanto, os efeitos indiretos mediados pelas plantas através do inseto ou diretamente sobre os entomopatógenos podem ser mais importantes.

De maneira abrangente, as plantas podem influenciar o processo de infecção dos fungos entomopatogênicos, de modo direto ou indireto, mediante modificações nos insetos hospedeiros ou mesmo em outros elementos do sistema (Cory & Hoover, 2006). Os efeitos diretos podem ser causados por compostos produzidos pela planta e que afete a infecção fúngica no inseto, como voláteis emitidos pelas plantas. Já os efeitos indiretos podem manifestar-se antes ou após a exposição do inseto ao fungo e envolvem fatores que alteram a condição nutricional do inseto, nesse contexto, pode abranger elementos como massa corporal, níveis de reserva energética e a capacidade de resistir a infecções, como através da imunidade inata e adquirida (Cory & Hoover, 2010).

No que concerne aos efeitos indiretos, pode, por vezes, ser mais desafiador evidenciar a causa e o efeito, e a distinção entre efeitos diretos e indiretos pode ser confusa, especialmente em situações em que os insetos sequestram substâncias químicas secundárias das plantas que poderiam exercer um efeito direto sobre os fungos entomopatogênicos ou um efeito indireto, através da condição do inseto. Os efeitos indiretos, podem abarcar: (1) A qualidade vegetal, seja por meio de aleloquímicos ou nutrientes, alterando a condição do inseto (imunidade) e, portanto, a resistência a doenças, (2) modificações na qualidade nutricional e morfológica do inseto (por exemplo, espessura da cutícula) que influenciam o processo de infecção, (3) variações na taxa de crescimento, que podem modificar a exposição do inseto a fungos entomopatogênicos e (4) a estrutura da vegetal alterando o comportamento dos insetos e, assim, a taxa de encontro com os fungos (Cory & Hoover, 2006; Cory & Hoover, 2010).

Um dos primeiros estudos sobre este tópico mostrou que os voláteis das folhas verdes do tabaco, *Nicotiana tabacum* L., inibiu a germinação de conídios de *Pandora neoaphidis* e avaliação *in vitro* taxa de crescimento (Brown et al., 1995). Um estudo posterior sobre *P. neoaphidis* utilizando a fava *Vicia faba* L. como planta hospedeira e *Acyrtosiphon pisum* (Harris) como alvo, mediu o efeito de voláteis de *V. faba* danificado por *A. pisum* em vários estágios da infecção e descobriram que a exposição aos voláteis não tinha efeito sobre o número de conídios, tamanho dos conídios ou em taxa de crescimento fúngico *in vitro* (Baverstock et al., 2005).

Em um sistema diferente, envolvendo a interação entre o ácaro verde da mandioca, *Mononychellus tanajoa*, e o patógeno fúngico *Neozygites tanajoe* (Entomophthorales: Neozygiteaceae), Hountondji et al., (2005) descobriram que os voláteis das folhas verdes por si só suprimiram a germinação dos conídios enquanto os voláteis induzidos por herbívoros promoveram a germinação, sugerindo que fungo é capaz de sincronizar a sua produção de conídios com a presença de hospedeiros que se alimentam ativamente e não apenas com sinais de plantas.

Além dos voláteis emitidos, outro ponto que provavelmente tem impacto na ação dos fungos entomopatogênicos é a superfície foliar ou filoplano. As superfícies das folhas variam em morfologia, estruturas superficiais (como mais ou menos tricomas) e presença de substâncias cuticulares, como ceras, que podem alterar a retenção de conídios, a sobrevivência dos conídios, a taxa de germinação ou alterar o comportamento dos insetos, o que por sua vez alterará as taxas de aquisição de fungos (Inyang et al., 1998). Por exemplo, a germinação de *M. anisopliae* foi maior em folhas sem cera do que em folhas intactas de uma variedade de crucíferas, e exsudados de folhas e extratos solúveis aumentaram a germinação e a virulência do besouro da mostarda *Phaedon cochlearia* (F.) (Inyang et al., 1999).

Ao contrário de outros entomopatógenos, os fungos tem como principal forma de infecção o contato, via normal de infecção. Por essa razão os fungos devem persistir no filoplano até serem adquiridos pelo hospedeiro (se não forem pulverizados diretamente sobre ele) e, como os exemplos acima mostraram, as características da superfície da planta podem ter uma grande influência neste processo. Portanto existe a possibilidade de que as plantas possam influenciar a sobrevivência dos fungos e, em consequência, a seleção de certos isolados. Não há registros na literatura que tenha explorado essa perspectiva em fungos entomopatogênicos. Entretanto, caso as populações naturais de fungos englobem genótipos diversos, apresentando variações em características fundamentais de origem

genética (como a aderência à superfície do filoplano), é possível que ocorra uma seleção em prol de genótipos específicos.

1.3.6. Marcadores moleculares: uma ênfase nos microssatélites

Nos últimos anos, houve notáveis progressos nas investigações agrícolas devido à difusão e ampliação do acesso às técnicas de pesquisa de DNA e RNA. A utilização da biologia molecular na agricultura abarca várias esferas, ressaltando-se a genômica de vegetais e artrópodes, a engenharia genética e o desenvolvimento de indicadores moleculares. No âmbito dos estudos de ecologia microbiana, as técnicas moleculares, fundamentadas na análise do DNA, promoveram avanços significativos, possibilitando uma compreensão mais profunda da biologia e filogenia de fungos e bactérias (Ranjard et al., 2000; Wang et al., 2004; Oulevey et al., 2009; Rezende., 2015; Pattemore et al., 2014; Schneider et al., 2012; D'Alessandro et al., 2014).

Um marcador molecular é um "locus" polimórfico que identifica o genótipo do portador individual. Dessa forma, esses indicadores podem ser derivados de qualquer tipo de informação molecular que demonstre um polimorfismo detectável entre os organismos a serem contrastados (Salles et al., 2003). Os métodos de rotulação molecular podem ser divididos em duas grandes categorias: os indicadores do tipo RFLP (Análise de fragmentos polimórficos restritos), que se fundamentam na variabilidade nas sequências de nucleotídeos do DNA genômico após a digestão por enzimas de restrição (Botstein et al., 1980), e os indicadores baseados no procedimento em cadeia da polimerase (PCR), que abrangem técnicas como Polimorfismo Amplificado de DNA ao acaso (RAPD), Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) os Microssatélites (SSR) (Kepler et al., 2015) e os ISSR (Zhang et al., 2016).

Com a maior disponibilidade de métodos de sequenciamento genético e marcação molecular, muitos pesquisadores buscam investigar divergências filogenéticas ou aprofundar a compreensão da dinâmica e ecologia de fungos no ambiente, algo que anteriormente não era possível apenas com base no conhecimento da morfologia. Entre os métodos aplicados para caracterização de isolados de *Metarhizium* spp., destacam-se: RAPD (Bidochka et al., 2001, Tigano & Aljanabi, 2000), RFLP (Velásquez et al., 2007), SSR ou microssatélites (Enkerli et al., 2005; Freed et al., 2010; Kepler et al., 2015) e AFLP (Boucias et al., 2000b).

A utilização de microssatélites (SSR) tem se destacado em estudos filogenéticos, estrutura populacional e diversidade genética de fungos. Esses marcadores consistem em

sequências repetidas em tandem de um a seis nucleotídeos, distribuídas por todo o genoma (Jarne & Lagoda, 1996). O polimorfismo é representado pela variação no número de elementos repetidos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Os marcadores SSR são codominantes, abundantes e requerem pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados, e uma vez obtidos os iniciadores ("primers") informativos para uma espécie/isolado, os custos e a demanda de mão-de-obra são drasticamente reduzidos, tornando os ensaios laboratoriais rápidos e a técnica mais acessível (Salles et al., 2003).

Estudos de Enkerli et al., 2005 e Oulevey et al., 2009, identificaram 41 microssatélites reconhecidos para o gênero *Metarhizium*. Esses microssatélites foram reconhecidos em espécies como *M. anisopliae*, *M. brunneum* e *M. robertsii*. No entanto, Mayerhofer et al., 2015, validou recentemente entre 15 e 34 regiões de microssatélites desses 41 originalmente descritos, para espécies como *M. guizhouense*, *M. lepidiotae*, *M. majus* e *M. pingshaense*. Estudos que empregaram marcadores do tipo microssatélites para distinguir isolados de *Metarhizium* spp. (Velásquez et al., 2007; Kepler et al., 2015) destacaram a eficácia dessa técnica, posicionando-a como uma ferramenta eficiente para estudos de monitoramento de produtos formulados aplicados em campo.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, M., Iqbal, A. M., Ahmad, Z. 2003. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. **Crop Protection**, v.22, n.1, p.539-544.
- Alford, A. R., Hammond Junior, A. M. 1982. *Plusiinae* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with looplurebaited traps. *Journal of Economic Entomology*. v. 75, p. 647-650.
- Alves, S. B., Lecuona, R. E. 1998. **Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos** In: ALVES, S. B.; (ED). Controle microbiano de insetos. 2º edição ed. Piracicaba FEALQ, p. 97-167.
- Arimura, G., Matsui, K., Takabayashi, J. 2009. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, p. 911–923.
- Ávila, C. J., Vivan, L. M., Tomquelski, G. V. 2013. **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, p. 12.
- Bidochka, M. J., Mcdonald, M. A., Leger, R. J. S., Roberts, D. W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, New York, v.2, p. 107–113.
- Binneck, E., Lastra, C. C. L., Sosa-Gómez, D. R. 2019. Genome sequence of *Metarhizium rileyi*, a microbial control agent for Lepidoptera. **Microbiology Resource Announcement**, v. 8, n.36, p.1-3.
- Boiko, S. M. 2022. Identification of novel SSR markers for predicting the geographic origin of fungus *Schizophyllum commune* Fr. **Fungal Biology**, v. 126, p. 764 – 774.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v.32, p. 314–331.
- Boucias, D. G., Pendland, J. C. 1982. Ultrastructural studies on the fungus, *Nomuraea rileyi*, infecting the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 39, p. 338-345.
- Boucias, D. G., Pendland, J. C., Latge, J. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, p. 1795-1805.

- Boucias, D.G., Stokes, A. Suazo, J. 2000a. Funderburk AFLP analysis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, v. 92, p. 638-648.
- Boucias, D. G., Tigano, M. S., Sosa-Gómez, D. R., Glare, T. R., Inglis, P. W. 2000b. Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Biological Control**, v. 19, p. 124-138.
- Brown, G. C., Prochaska, G. L., Hildebrand, D. F., Nordin. G. L., Jackson, D. M. 1995. Green leaf volatiles inhibit conidial germination of the entomopathogen *Pandora neophididis* (Entomophthorales: Entomophthoraceae). **Environmental Entomology**, v. 24, p.1637–1643.
- Bueno, R. C. O. F., Parra, J. R. P., Bueno, A. F., Haddad, M. L. 2009. Desempenho de tricogramatídeos como potenciais agentes de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v. 38, n. 3, p. 389-394.
- Burleigh, J. G. 1972. Population dynamics and biotic controls of the soybean looper in Louisiana. **Environmental Entomology**, v. 1, n. 3, p. 290-294.
- Conab, Disponível em <https://www.conab.gov.br/>, acesso em 08/01/2023.
- Costa, V. H. D., Soares, M. A., Rodríguez, F. A. D., Zanuncio, J. C., Silva, I. M., Valicente, F. H. 2015. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 796-798.
- Cory, J. S., Hoover, K. 2006. Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, p. 278–286.
- Cory, J. S., Ericsson, J. D. 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. **BioControl**, v. 55, p. 75–88.
- Czepak, C., Albernaz, K. C., Vivan, L. M., Guimarães, H. O., Carvalhais, T. 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p. 110-113.
- D'Alessandro, C. P., Jones, L. R., Humber, R. A., López Lastra, C. C., Sosa-Gómez, D. R. 2014. Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1-alpha sequences. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 54, n. 1, p. 21–31.
- Demoraes, C. M., Lewis, W. J., Pare, P. W., Alborn, H. T., Tumlinson, J. H. 1998. Herbivore-infected plant selectively attract parasitoids. **Nature**, v. 393, v. 570–573.
- Durigan, M. R., Corrêa, A. S., Pereira R. M., Leite, N. A, Amado, D. S. D., Omoto, C.2017. High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. **Pesticide Biochemxx Physiology**, n. 143, p. 73-80.

- Edelstein, J. D., Lecuona, R. E., Trumper, E. V. 2004. Selection of culture media and in vitro assessment of temperature-dependent development of *Nomuraea rileyi*. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 145-155.
- Enkerli, J., Kölliker, R., Keller, S., Widmer, F. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 384–386.
- Fitt, G. P. 1989. The ecology of *Heliothis species* in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 17-52.
- Freed, S., Jin, F.L., Ren, S. X. 2010. Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from different geographical origins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 359–370.
- Fronza, E., Specht, A., Heinzen, H., Barros, N. M. 2017. *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* as biological control agents. **Biocontrol Science & Technology**, v. 27, p. 1243-1264.
- Goettel, M. S., Eilenberg, J., Glare, T. 2010. **Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations**. In: Laurence, I. G.; Sarjeet, S. G (Eds). *Insect control: Biological and synthetic Agents*. 1^a ed ELSEVIER, p. 387-437.
- Gols, R., Harvey, J. A. 2009. Plant-mediated effects in the Brassicaceae on the performance and behaviour of parasitoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, p. 187–206.
- Herzog, D. C. **Sampling soybean looper on soybean**. In: Kogan, M.; Herzog, D.C. (Eds.). **Sampling Methods in Soybean Entomology**. New York: Springer, 1980, p. 141-168.
- Hountondji, F. C. C., Sabelis, M. W., Hanna, R., Janssen, A. 2005. Herbivore-induced plant volatiles trigger sporulation in fungal entomopathogens: the case of *Neozygites tanajoae* infecting the cassava green mite. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 1003–1021.
- Humber, R. A., Hansen, K. S., Wheeler, M. M. **Catalog of species**. Ithaca: ARSef ARS **Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures**; 2011. p. 517
- Ignoffo, C. M., Puttler, B., Hostetter, D. L., Dickerson, W. A. 1976. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 28, p. 259-262.
- Ignoffo, M. C., Boucias, B. D. 1992. Relative activity of geographical isolates of *Nomuraea bioassayed* against the cabbage looper and velvetbean caterpillar. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 215-217.
- Inbar, M., Gerling, G. 2008. Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 431–448.
- Inyang, E. N., Butt, T. M., Ibrahim, L., Clark, S. J., Pye, B. J., Beckett, A., Archer, S. 1998. The effect of plant growth and topography on the acquisition of conidia of the insect

pathogen *Metarhizium anisopliae* by larvae of *Phaedon cochleariae*. **Mycological Research**, 102:1365–1374.

Inyang, E. N., Butt, T. M., Beckett, A., Archer, S. 1999. The effect of crucifer epicuticular waxes and leaf extracts on the germination and virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, v. 103, n. 4, p. 419-426.

Jackson, M. A., Dunlap, C. A., Jaronski, S. T. 2009. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **The Ecology of Fungal Entomopathogens**, p. 129–145.

Jarne, P., Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v.11, p.424-9.

Jin, T., Silva, A. L., Prado, P. C. N., Cunha, H. P. 1978. Avaliação da mortalidade natural de *Trichoplusia ni* (Hueb., 1802) e *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) por diversos microorganismos, **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 8, n. 1, p. 31-37.

Kepler, R. M., Ugine, T. A., Maul, J. E., Cavigelli, M. A., Rehner, S. A. 2015. Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. **Environmental Microbiology**, v.8, p.2791-2804.

Kish, L. P., Samson, R. A., Allen, G. E. 1974. The genus *Nomuraea* Moulenc. **Journal of Invertebrate Pathology**, 24,154-158.

Kogan, M., Turnipseed, S. G., Shepard, M., Oliveira, E. B., Borgo, A. 1977. Pilot insect pest management program for soybean in southern Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, p. 659-663.

Licona-Juárez, C. K., Bezerra, A. V. S., Oliveira, T. C. I., Massingue, C. D., Medina, H. R., Rangel, D. E. N. 2023. Congo red induces trans-priming to UV-B radiation in *Metarhizium robertsii*. **Fungal Biology**, v. 127, p. 1544-1550.

Marois, J. J., Nelson, J. K., Morrinson, J. C., Lile, L. S., Bledsoe, A. M. 1986. The influence of berry contact within grape clusters on the development of *Botrytis cinerea* and epicuticular wax. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.37 p. 293-296.

Michereff, F. M., Faria, M. R., Wraight, S. P., Silva, K. F. A. S. 2009. **Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas?** Arquivos do Instituto Biológico (Online), v. 76, p. 769-779.

Moscardi, F., Bueno, A. F., Sosa-Gómez, D. R., Roggia, S., Hoffman-Campo, C. B., Pomari, A. F., Corso, I. C., Yano, S. A. C. 1997. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Roderick, H. W., Thomas, B. J. Infection of ryegrass by three rust fungi (*Puccinia coronata*, *P. graminis* and *P. loliina*) and some effects of temperature on the establishment of the disease and sporulation. **Plant Pathology**, v. 46 p. 751-761.

Moscardi, F., Bueno, A. F., Sosa-Gómez, D. R., Roggia, S., Hoffmann-Campo, C. B., Pomari, A. F.; Corso, I. C., Yano, S.A.C. Hoffmann-Campo, C.B., Corrêa-Ferreira, B. S.;

Moscardi, F. (Eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes- praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 2013-334.

Oulevey, C., Widmer, F., Kölliker, R., Enkerli, J. 2009. An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. **Mycological research**, v. 113, n. Pt 9, p. 1016-24.

Pattimore, J. A., Hane, J. K., Williams, A. H. 2014. The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 660.

Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture- independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, n. 3, p. 167-77.

Rezende, J. M., Zanardo, A. B. R., Lopes, M. S., Delalibera, JR, I., Rehner, S. A. 2015. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. **BioControl**, v. 60, n. 4, p. 495-505.

Santos, S. R., Specht, A., Carneiro, E., Paula-Moraes, S. V., Casa-Grande, M. M. 2017. Interseasonal variation of *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 61 n. 4.

Schlotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 1, p. 63–69.

Schneider, S., Widmer, F., Jacot, K., Kölliker, R., Enkerli, J. 2012. Spatial distribution of *Metarhizium* clade 1 in agricultural landscapes with arable land and different semi-natural habitats. **Applied Soil Ecology**, v. 52, n. 1, p. 20–28.

Salles, G. B. C., Ciampi, A. Y., Moretzsohn, M. C., Amaral, Z. P. S., brondani, R. V. 2003. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 30, p.46-50.

Skoropad, W. P., Tewari, J. P. 1997. Field evaluation of the role of epicuticular wax in rapeseed and mustard in resistance to alternaria blackspot. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 57 p. 1001-1003.

Sosa-Gómez, D. R., Boucias, D. G., Nation, D. J. L. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* Cuticle and Fungistatic Effect of Cuticular Lipids and Aldehydes. **Journal of invertebrate pathology**, v.69, p.31–39.

Sosa-Gómez, D. R. 2002. **Fungos Entomopatogênicos: Catálogo de Isolados**. Série Documentos. Embrapa Soja. ISSN 1516-781X, p.188.

Sosa-Gómez, D. R.; Delpin, K. E.; Moscardi, F.; Nozaki, M. H. 2003. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 287-291.

Sosa-Gómez, D. R., Corrêa-Ferreira, B. S., Hoffmann-Campo, C. B., Corso, I. C., Oliveira, L. J., Moscardi, F., Panizzi, A. R., Bueno, A., Hirose, E. 2010. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSo, p. 90.

Sosa-Gómez, D. R., López, L. C. C., Humber, R. A. 2010. An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil. **Mycopathologia**, v. 170, p. 61–76.

Sosa-Gómez, D. R. **Implications of Plant Hosts and Insect Nutrition on Entomopathogenic Diseases**. Chapter 9. In: **Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management**. Panizzi, A.R. & Parra, J.R.P. CRC Press Taylor and Francis group-Embrapa, 2012.

Sosa-Gómez, D. R., Specht, A., Paula-Moraes, V. S., Lopes-Lima, A., Yano, S. A. C., Micheli, A., Morais, G. F., Gallo, P., Pereira, R. V. S., Salvadori, R. J., Botton, M., Zenker, M. M., Azevedo-Filho, W. S. 2016. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliiothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n 1, p. 101–104.

Sharma, P. K., Kumar, U., Vyas, S., Sharma, S., Shrivastava, S. 2012. Monitoring of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) through pheromone traps in chickpea (*Cicer arietinum*) crop and influence of some abiotic factors on insect population. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v.5, p. 44-46.

Specht, A., Sosa-Gómez, D. R. 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 689-692.

Specht, A., Paula-Moraes, S. V., Sosa-Gómez, D. R. 2015. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 59, p. 343–345.

Steinwender, B. M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg, J. 2011. Molecular diversity of the *Metarhizium anisopliae* lineage in an agricultural field. **Journal of Applied Entomology, Washington**, v. 66, p. 113–115.

Suzana, S. C., Rosa, F. C., Alves, L. F., Salvador, R. J. 2018. Consumption and use of soybean by the caterpillar *Helicoverpa armigera*. **Ciência Rural**, v. 48, p. 1-12.

Tigano-Milani, M. S., Faria, R. E. Lecuona, M. R. Sartori, E. Y. Arima, B. M. 1995. Análise de patogenicidade e germinação do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolado no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 53-60.

Velásquez, V. B., Cárcamo, M. P., Meriño, C. R., Iglesias, A. F., Durán, J. F. 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 89–99.

Wang, C., Fan, M., Li, Z., Butt, T. M. 2004. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, n. 4, p. 861-870.

Wu, K.M. 2007. Regional management strategy for cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in China. *Control of Insect Pests*, v.7, n.2, p.559-565.

CAPÍTULO 2. DIVERSIDADE GENÉTICA DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium rileyi* COM BASE EM MARCADORES MICROSATÉLITES

Tamires Doroteo de Souza^a, Sara Mataroli de Godoy^b, Daniele C. Feliciano^b, Eliseu Binneck^c, Drauzio E. N. Rangel^d, Daniel R. Sosa-Gómez^{c*}

^aDepartment of Zoology, Biological Science Sector, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil, ^b Department of General Biology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil, ^c Embrapa Soybean, 86085-981, Londrina, PR, Brazil, ^dUniversidade Tecnológica Federal do Paraná, 85660-000, Dois Vizinhos, PR, Brazil.

Manuscript submitted to Journal of Invertebrate Pathology on 24 Oct 2023, accepted on February 27th

RESUMO

Epizootias do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* regulam populações de lepidópteros pragas em cultivos de soja, algodão e amendoim, a tal ponto que aplicações de inseticidas podem ser desnecessárias. No entanto, a contribuição e como os diferentes isolados operam durante a epizootia são desconhecidas. Várias questões permanecem sem resposta: 1. Quantos genótipos de *M. rileyi* estão presentes durante uma epizootia? 2. Qual genótipo é o mais comum entre eles? 3. Os genótipos envolvidos nas epizootias anuais no mesmo local são iguais? Portanto, o desenvolvimento de marcadores moleculares para identificar com precisão esses genótipos é importante para responder a essas questões. Primers SSR foram desenhados por meio de prospecção *in silico* para discriminar genótipos e inferir a diversidade genética de isolados de *M. rileyi* provenientes da coleção mantida na Embrapa Soja. Foram testados 13 marcadores SSR em 136 isolados identificando 43 clones e 12 clusters genéticos diferentes, com diversidade genética variando de $H_s = 0,15$ (cluster I) a $H_s = 0,41$ (cluster IV) e uma diversidade média de 0,24. Nenhum cluster foi distinguido categoricamente com base em hospedeiro ou origem geográfica usando análise bayesiana. No entanto, alguns agrupamentos compreenderam a maioria dos isolados com origem geográfica comum; por exemplo, o cluster VIII foi composto principalmente por isolados do Centro-Oeste do Brasil, o cluster II do Sul do Brasil e o cluster XII com isolados de Quincy, norte da Flórida, USA. Regiões sub representadas, como isolados do Japão, Filipinas e Indonésia foram colocadas nos grupos IX e X. Embora os isolados analisados tenham mostrado evidências de estrutura clonal, os índices de diversidade genética sugerem um potencial para a espécie se adapte a diferentes condições ambientais.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos, marcadores SSR, epizootias, genótipo, Clavicipitaceae

GENETIC DIVERSITY OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Metarhizium rileyi* BASED ON DE NOVO MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

Epizootics of the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* regulate lepidopteran populations in soybean, cotton, and peanut agroecosystems to the point that insecticide applications could be unnecessary. However, the contribution and how different strains operate during the epizootic are unknown. Several, unanswered questions remain: 1. How many genotypes of *M. rileyi* are present during an epizootic? 2. Which genotype is the most common among them? 3. Are the genotypes involved in annual epizootics at the same location the same? Therefore, the development of molecular markers to accurately identify these genotypes is very important to answer these questions. SSR primers were designed by prospecting *in silico* to discriminate genotypes and infer the genetic diversity of *M. rileyi* isolates from the collection kept at Embrapa Soybean. We tested 13 SSR markers on 136 isolates to identify 43 clones and 12 different genetic clusters, with genetic diversity ranging from $H_s = 0.15$ (cluster I) to $H_s = 0.41$ (cluster IV) and an average diversity of 0.24. No clusters were categorically distinguished based on hosts or geographical origin using Bayesian clustering analysis. Nonetheless, some clusters comprised most of the isolates with a common geographic origin; for example, cluster VIII was mainly composed of isolates from Central-western Brazil, cluster II from Southern Brazil, and cluster XII from Quincy, Northern Florida, in the United States. Underrepresented regions (few isolates) from Pacific Island nations of Japan, the Philippines, and Indonesia (specifically from Java) were placed into clusters IX and X. Although the analyzed isolates have shown evidence of clonal structure, the genetic diversity indices suggest a potential for the species to adapt to different environmental conditions.

Keywords: Entomopathogenic fungi, SSR markers, Epizootics, Genotype, Clavicipitaceae

1. INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* é um importante agente de controle natural de lepidópteros pragas economicamente significativas. Suas epizootias podem provocar casos isolados de doenças ou dizimar populações de diversas espécies das famílias Noctuidae (*Chrysodeixis includens*, *Rachiplusia nu*, *Hypena scabra*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *Spilosoma virginica* e *S. obliqua*) e Erebidae (*Anticarsia gemmatalis* e *Alabama argillacea*) (Allen et al., 1971; Ignoffo, 1981; Devi et al., 2003; Sosa-Gómez et al., 2010; Sánchez-Peña, 2010). Uma alta prevalência de *M. rileyi* tem sido observada em culturas economicamente importantes, como soja, algodão, amendoim e milho (Corrêa-Ferreira & Smith, 1975; Devi et al., 2003, 2007; Firake e Behere, 2020), bem como em culturas menores, incluindo feijão guandu (*Cajanus cajan*) e feijão mungo (*Vigna radiata*) (Manjula et al., 2003; Ingle et al., 2004).

Apesar de importância como agente epizoótico, a composição genotípica nas ocorrências epizoóticas tem sido pouco estudada. Boucias et al. (2000), utilizando AFLP como marcador molecular, detectaram extenso polimorfismo em isolados coletados em Quincy, Norte da Flórida, EUA, e observaram que os mesmos haplótipos isolados de *A. gemmatalis*, *C. includens* e *Hypena scabra* ocorriam no mesmo local, sendo que um haplótipo predominante foi isolado em anos sucessivos de epizootias. Teoricamente, o genótipo mais prevalente poderia ter melhor adequação às condições locais, aumentando assim as probabilidades de sucesso em epizootias induzidas artificialmente ou como agente de controle microbiano.

Considerando que um genótipo pode prevalecer durante o processo epizoótico, e que o mesmo haplótipo pode ser isolado múltiplas vezes, isso pode resultar em acessos redundantes nas coleções desses microorganismos. No entanto, também é possível que ocorra alguma ligeira deriva do genoma durante uma epizootia em curso, o que pode ser detectada por comparações de coleções precoces e tardias de uma epizootia usando ferramentas moleculares. Portanto, no processo de seleção de acessos com o mesmo genótipo básico, deve-se considerar a possibilidade de encontrar alterações genômicas sutis.

O desenvolvimento de ferramentas precisas para a caracterização desse agente de controle poderia ajudar a abordar vários aspectos, como evitar redundância em coleções de culturas, rastrear o destino dos isolados aplicados no campo e estabelecer isolados de referência durante a submissão do registro de bioinseticidas às agências reguladoras.

Além disso, ferramentas confiáveis poderiam ser desenvolvidas para avaliar a distribuição temporal e espacial da estrutura genética das populações de *M. rileyi*. A falta de variação observada para a região ITS (Boucias et al., 2000b), para a sequência de rDNA mitocondrial de *M. rileyi* (Sosa-Gómez, et al., 2009), para o gene da tubulina (Han et al., 2002), e para o gene da calmodulina (resultados não publicados) justificam nosso interesse em desenvolver marcadores microssatélites, que geralmente apresentam polimorfismo suficiente para diferenciar genótipos. Neste estudo, desenvolvemos marcadores microssatélites para avaliar a diversidade genética de isolados de *M. rileyi* coletados no Brasil e acessos obtidos de coleções de culturas estabelecidas. Além disso, procuramos fornecer caracterizações precisas de seus haplótipos multilocus.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origens dos isolados

Isolados de *M. rileyi* (n=136) foram obtidos da Coleção de Culturas da Embrapa Soja (Sosa-Gómez e Silva, 2002), coletadas entre 1974 e 2021, bem como da Coleção de Culturas de Entomopatogênicos Fúngicos do USDA-ARS (ARSEF; Humber, 2014) (Tabela 1 e Figura 1).

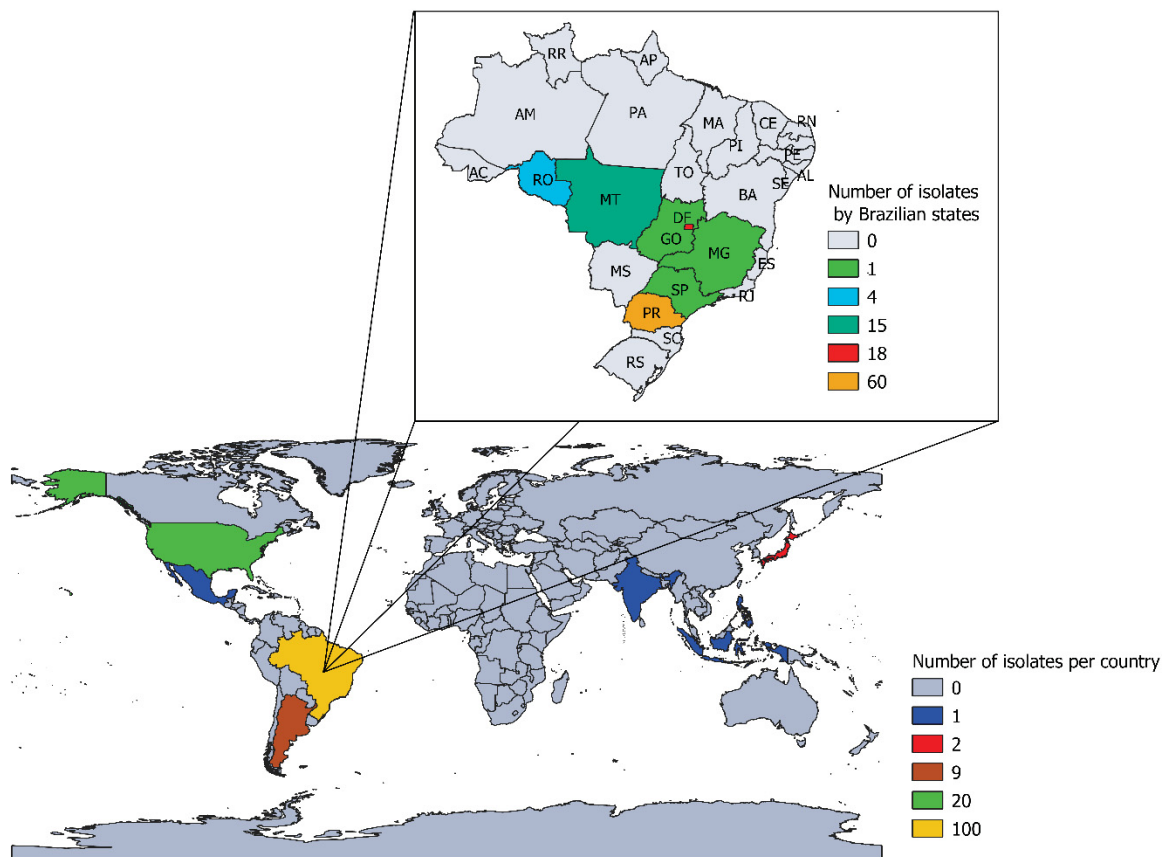


Figura 1. Distribuição geográfica do isolados *Metarhizium rileyi* utilizados no estudo.

2.2. Prospecção *in silico* e desenvolvimento de primers microssatélites

Os marcadores microssatélites foram previstos computacionalmente com base nas sequências de nucleotídeos do genoma de *M. rileyi*, cepa Cep018-CH2/ARSEF 7053, publicada anteriormente (número de acesso do GenBank GCA_007866325.1) (Binneck et al., 2019). Motifs de 1 a 6 pb foram identificados em todo o genoma usando scripts Perl da ferramenta MISA (Thiel, 2003). Foram desconsiderados loci de elementos repetidos com menos de 10 nucleotídeos, totalizando 6.126 marcadores identificados, com densidade global de 197 loci por Mbp. Após análise de cada locus contra outro genoma de *M. rileyi* disponível, cepa RCEF 4871 (número de acesso do GenBank GCA_001636745.1) (Shang et al., 2019), 1.440 loci foram previstos como supostos polimorfos. Dos 1.440 loci, 18 foram selecionados para posterior amplificação dos marcadores, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), e os pares de primers que flanquearam essas regiões foram desenhados pelo Primer3 versão 2.3.7 (Untergasser et al., 2012), utilizando parâmetros padrão. Os loci marcadores tinham motifs de 2 a 6 pb, com amplicons previstos variando de 100 a 280 pb.

Tabela 1. Dados de coleta para 136 isolados de *Metarhizium rileyi* (nome, hospedeiro local, ano de coleta, genótipo, clone e haplótipo) e números de acesso do GenBank para sequências de calmodulina.

Isolado	Hospedeiro	Cidade de coleta	Ano de coleta	Clone	Haplótipo	GenBank
Cluster I						
CNPSoMr10	Larva de lepidópteros	Assis, SP, Brasil	1990	-	H1	OR683161
CNPSoMr115	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Chivilcoy, Bs. As., Argentina	1996	-	H1	OR683162
CNPSoMr118	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Chivilcoy, Bs. As., Argentina	1996	-	H1	OR683163
CNPSoMr135	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1998	-	H3	OR683164
CNPSoMr174	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H3	OR683165
CNPSoMr176	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683166
CNPSoMr209	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H3	OR683167
CNPSoMr230	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H3	OR683168
CNPSoMr265	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H3	OR683169
CNPSoMr268	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	Clone CNPSoMr265	-	
CNPSoMr269	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	Clone CNPSoMr265	-	
CNPSoMr270	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	Clone CNPSoMr265	-	
CNPSoMr275	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H3	OR683170
CNPSoMr276	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H3	OR683171
CNPSoMr278	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	Clone CNPSoMr265	-	
CNPSoMr287	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2000	Clone CNPSoMr230	-	
CNPSoMr290	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2000	-	H1	OR683172
CNPSoMr291	<i>Chrysodeixis includens</i>	Warta, PR, Brasil	2000	Clone CNPSoMr230	-	
CNPSoMr433	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2003	-	H3	OR683173

Isolado	Hospedeiro	Cidade de coleta	Ano de coleta	Clone	Haplótipo	GenBank
CNPSoMr435	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H3	OR683174
CNPSoMr436	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H3	OR683175
CNPSoMr438	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H1	OR683176
CNPSoMr439	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H3	OR683177
CNPSoMr442	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H3	OR683178
CNPSoMr444	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H1	OR683179
CNPSoMr448	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	Clone CNPSoMr438	-	
CNPSoMr451	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	Clone CNPSoMr444	-	
CNPSoMr457	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2002	Clone CNPSoMr230	-	
CNPSoMr459	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2003	Clone CNPSoMr174	-	

Cluster genético II

CNPSoMr22	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1990	-	H1	OR683180
CNPSoMr32	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Ponta Grossa, PR, Brasil	1990	-	H1	OR683181
CNPSoMr66	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1992	-	H1	OR683182
CNPSoMr149	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Oliveros, Bs As., Argentina	1998	-	H1	OR683183
CNPSoMr166	Larva de lepidópteros	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683184
CNPSoMr167	Larva de lepidópteros	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr170	Larva de lepidópteros	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr178	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr180	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr194	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683185
CNPSoMr203	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683186
CNPSoMr204	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683187

Isolado	Hospedeiro	Cidade de coleta	Ano de coleta	Clone	Haplótipo	GenBank
CNPSoMr207	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr223	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr225	<i>Chrysodeixis includens</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr227	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr233	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr241	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr251	<i>Chrysodeixis includens</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr254	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr266	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H1	OR683188
CNPSoMr284	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2000	Clone CNPSoMr166	-	
CNPSoMr455	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2002	Clone CNPSoMr66	-	
CNPSoMr487	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Santa Fé, Sta. Fé, Argentina	2002	-	H1	OR683189
CNPSoMr489	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Buenos Aires, Argentina	2001	-	H1	OR683190
CNPSoMr491	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Buenos Aires, Argentina	2001	Clone CNPSoMr489	-	
Cluster III						
CNPSoMr27	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1990	-	H1	OR683191
CNPSoMr175	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683192
CNPSoMr181	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683193
CNPSoMr193	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683194
CNPSoMr195	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683195
CNPSoMr208	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683196
CNPSoMr220	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683197

Isolado	Hospedeiro	Cidade de coleta	Ano de coleta	Clone	Haplótipo	GenBank
CNPSoMr221	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683198
CNPSoMr222	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683199
CNPSoMr286	<i>Chrysodeixis includens</i>	Warta, PR, Brasil	2000	-	H1	OR683200
CNPSoMr458	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2003	-	H1	OR683201
Cluster IV						
CNPSoMr33	<i>Chrysodeixis includens</i>	Warta, PR, Brasil	1990	-	H1	OR683202
CNPSoMr72	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Warta, PR, Brasil	1993	-	H1	OR683203
CNPSoMr169	Larva de lepidópteros	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683204
CNPSoMr206	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1998	-	H1	OR683205
Cluster V						
CNPSoMr145	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Chivilcoy, Bs. As., Argentina	1996	-	H2	OR683206
CNPSoMr171	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H2	OR683207
CNPSoMr238	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr171	-	
Cluster VI						
CNPSoMr185	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H1	OR683208
CNPSoMr188	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H2	OR683209
CNPSoMr237	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Warta, PR, Brasil	1999	-	H2	OR683210
CNPSoMr250	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Warta, PR, Brasil	1999	Clone CNPSoMr237	-	
CNPSoMr421 (ARSEF 1879)	Larva de lepidópteros	Honiara Guadalcanal	1985	-	H2	OR683211
CNPSoMr426	Larva de lepidópteros	México	2000	-	H2	OR683212
CNPSoMr427	<i>Spodoptera</i>	Índia	2002	-	H2	OR683213

Isolado	Hospedeiro	Cidade de coleta	Ano de coleta	Clone	Haplótipo	GenBank
CNPSoMr-482	<i>Chrysodeixis includens</i>	Bela Vista do Paraíso, PR, Brasil	2005	-	H2	OR683214
CNPSoMr-485	<i>Alabama argillacea</i>	Santiago del Estero, Argentina	2001	-	H1	OR683215
CNPSoMr-488	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Buenos Aires, Argentina	2005	-	H2	OR683216
CNPSoMr-493	<i>Spodoptera</i>	Vilhena, RO, Brasil	2006	-	H2	OR683217
CNPSoMr-494	<i>Spodoptera</i>	Vilhena, RO, Brasil	2006	-	H2	OR683218
CNPSoMr-495	<i>Spodoptera</i>	Vilhena, RO, Brasil	2006	-	H2	OR683219
CNPSoMr-611	<i>Rachiplusia nu</i>	Warta, PR, Brasil	2021	-	H2	OR683220
CNPSoMr-612	<i>Rachiplusia nu</i>	Warta, PR, Brasil	2021	-	H2	OR683221

Cluster VII

CNPSoMr-100	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1997	-	H1	OR683222
CNPSoMr-263	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H1	OR683223
CNPSoMr-434	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H1	OR683224
CNPSoMr-443	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H3	OR683225
CNPSoMr-446	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H3	OR683226
CNPSoMr-447	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H3	OR683227
CNPSoMr-452	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H3	OR683228
CNPSoMr-453	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	-	H3	OR683229
CNPSoMr-454	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Rio Verde, GO, Brasil	2003	-	H3	OR683230
CNPSoMr-462	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Campo Novo dos Parecis, MT, Brasil	2003	Clone CNPSoMr-443	-	-
CNPSoMr-544	<i>Chosyne lacinia</i>	Warta, PR, Brasil	2007	-	H1	OR683231
CNPSoMr-597	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2018	Clone CNPSoMr-100	-	-
CNPSoMr-604	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Vilhena, RO, Brasil	2018	-	H1	OR683232

Isolado	Hospedeiro	Cidade de coleta	Ano de coleta	Clone	Haplótipo	GenBank
CNPSoMr607	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2018	-	H3	OR683233
Cluster genético VIII						
CNPSoMr147	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Patos de Minas, MG, Brasil	1998	-	H1	OR683234
CNPSoMr150	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Brasília, DF, Brasil	1996	-	H1	OR683235
CNPSoMr151	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Brasília, DF, Brasil	1996	-	H1	OR683236
CNPSoMr152	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Brasília, DF, Brasil	1996	-	H1	OR683237
CNPSoMr264	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H1	OR683238
CNPSoMr267	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H1	OR683239
CNPSoMr277	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H1	OR683240
CNPSoMr280	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H1	OR683241
CNPSoMr304	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999	-	H1	OR683242
Cluster IX						
CNPSoMr419 (ARSEF 1047)	<i>Plusia</i> sp.	Fuchu Tokio Prefecture-Japan Arsef 1047	1980	-	H1	OR683243
CNPSoMr420 (ARSEF 1761)	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Los Baños, Manila, Philippines	1984	-	H1	OR683244
Cluster X						
CNPSoMr422 (ARSEF 2345)	<i>Naranga</i> sp.	Tengoh-Jawa, Java, Indonesia	1986	-	H3	OR683245
Cluster XI						
CNPSoMr156	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Brasília, DF, Brasil	1988	-	H2	OR683246
CNPSoMr418 (ARSEF 1014)	<i>Spodoptera litura</i>	Fuchu Tokio Prefecture-Japan	1978	-	H2	OR683247
CNPSoMr589	<i>Chrysodeixis includens</i>	Gainesville, FL, USA	1974	-	H1	OR683248

Isolado	Hospedeiro	Cidade de coleta	Ano de coleta	Clone	Haplótipo	GenBank
Cluster XII						
CNPSoMr137	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1993	-	H1	OR683249
CNPSoMr138 (93-24B) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1993	-	H1	OR683250
CNPSoMr139	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1993	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr140 (93-10C) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1993	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr141 (93-13C) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1993	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr142 (93-9D) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1993	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr142 (94-11a) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1994	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr143	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1994	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr144 (93-12D) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1993	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr146 (94-4b) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1994	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr153 (94-6E) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1994	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr154 (94-4E) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1994	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr155 (94-6B) ²	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1994	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr423	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1994	-	H1	OR683251
CNPSoMr425	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1994	Clone CNPSoMr423	-	
CNPSoMr590 (ARSEF 6868)	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Gainesville, FL, USA	2000	-	H1	OR683252
CNPSoMr591 (ARSEF 6869)	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1994	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr592 (ARSEF 6870)	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	2000	-	H1	OR683253
CNPSoMr593 (ARSEF 6871)	Larva de Lepidoptera	Quincy, FL, USA	1993	Clone CNPSoMr138	-	
CNPSoMr594 (ARSEF 6872)	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1993	Clone CNPSoMr138	-	

2.3. Extração e quantificação de DNA

Os isolados foram cultivados em meio SMAY (ágar Sabouraud-maltose mais extrato de levedura, composto por 4% de maltose, 1% de neopeptona, 1% de extrato de levedura, ágar 1,5%) e mantidos em câmaras do tipo BOD a 27 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante 12 dias.

As colônias com conídios ou micélios foram inoculadas em 50 mL de meio SMY sem ágar, em mesa vibratória a 250 rpm, e os isolados foram incubados por 10 dias a 26°C. As hifas fúngicas foram coletadas por filtração, lavadas com água destilada estéril e liofilizadas (Lyophilizer LS3000TERRONI®). Para cada isolado, 150 mg das preparações miceliais foram então congeladas e trituradas utilizando um almofariz e pilão mais nitrogênio líquido. Eles foram imediatamente transferidos para o tampão CTAB proposto por Rogers & Bendich (1988), com alterações no tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, CTAB 2%, NaCl 1,4 M 1% b-mercaptoetanol). As amostras foram homogeneizadas em misturador vórtex e incubadas a 65°C por 1h.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 16.000g. A fase superior foi coletada, adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e repetida a etapa de centrifugação. O DNA foi precipitado com isopropanol gelado (2/3 do volume do sobrenadante), sedimentado por centrifugação e lavado com etanol a 70%. Os sedimentos secos foram ressuspensos à temperatura ambiente em tampão TE 0,1 mM (Tris-EDTA) pH 8,0 contendo 40 µl/ml de RNase. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%, conduzida em tampão TBE 1X, a 120V por 1 h.

Após a corrida, o gel foi corado com 10 mg.ml⁻¹ de brometo de etídio e visualizado em transiluminador L-PIX IMAGE 7.1 M Pixel, sendo a imagem capturada pelo programa L-PIX IMAGE 1.0.1 (Loccus Biotecnologia, São Paulo). A concentração de DNA foi estimada usando um espectrômetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE), e as amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng/µl.

2.4. Amplificação de regiões SSR

Das 1.440 regiões de microssatélites previstas como supostamente polimórficas através de uma comparação de sequências de dois genomas de *M. rileyi*, foram sintetizados 18 pares de primers. Esses primers foram empregados para amplificar os microssatélites em 136 isolados da espécie (Tabela 2).

Tabela 2. Microsatélites polimórficos (F: forward; R: reverse) para isolados de *Metarhizium rileyi*. Temperatura de anelamento (Ta), número de alelos (Na), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e diversidade genética de Nei (Hs).

Loci	Primer (5'-3')	Motif	Ta (°C)	Tamanho do alelo (pb)	Na	PIC	Hs
Mri1	TTTGGCTGTAACGGCGAG R: GCAGATGAACTTGTGCGTGG	(CAGCAC) ₆	60	113 - 339	6	0.42	0.46
Mri2	TCAAACGCCACTCCCAAAC R: ATGGCAAAGTGCAAAGGCAAG	(CATC) ₅	60	178 - 198	5	0.36	0.38
Mri3	AGACGGCAGTCATGGTGAG R: CCATTCAGTCTTGCCCTGGT	(GTGC) ₅	60	190 - 326	7	0.66	0.71
Mri4	ACCTTGGTTTCGAGGGGAA R: TTTTGGCTTCGAAGGTGCG	(GGC) ₅	60	153 - 156	2	0.02	0.02
Mri5	CAAGTGGAGTGCCATGTCC R: TCCCAAAGTCACGAGCCAAA	(ACAT) ₁₀ C(CATA) ₆	60	158 - 246	8	0.67	0.73
Mri6	GACAACAGGCCACCATCC R: TCGATTCCACGGGACAATG	(TTG) ₅	60	183 - 222	5	0.18	0.19
Mri7	TTCAGTGGAGGTGGGAAGG R: CACCAACACTAGGCAGCAGA	(AGG) ₅	60	126 - 168	9	0.50	0.55
Mri8	AGAAGAAGCGCGGAAGAA R: GTCTGTAGACGCCACGCAAA	(AAG) ₇	60	272 - 314	6	0.44	0.50
Mri9	TCCCCTTTTCTTCCACCC R: ACAACGGAGAGAACAGAGCG	(TGATTG) ₅	60	ANS	-	-	-
Mri10	TGGGCTTTTGATTGGTCCG R: GCCAGGTGCAACGCATTATT	(TAGT) ₅	60	158	1	0.00	0.00
Mri11	GATCGACGAGTCCGTTCAA R: GCAAGTCGACGTCCAAACAG	(GGGCA) ₉	60	253 - 298	6	0.61	0.67
Mri12	TTCTGGCTATGGTGTGCCC R: GGGCCCGGACTGAACAAG	(CAG) ₇ X ₁₁ (CAG) ₇ X ₉ (CAG) ₅ X ₆₈ (GCA) ₁₂	60	206 - 223	16	0.82	0.85
Mri13	CTCTTCCTGCCCTCATTCG R: GATGTGGTCGACCTGGTTGT	(CTAT) ₅ X ₃₂ (CCATA) ₁₆	60	139 - 414	12	0.77	0.80

Loci	Primer (5'-3')	Motif	Ta (°C)	Tamanho do alelo (pb)	Na	PIC	Hs
Mri14	GCCTCTCCCCCTAAACAAT R: AGACGTGTAGAAATGCCACGG	(AC)6X22(AC)7X24(AC)7X6(AC)6X50(AC) 6	60	278 - 344	8	0.68	0.72
Mri15	GGGCATGGACTTGGAT R: AACTATGGAATGCAGGCGCT	(CACT)10	60	215 - 327	11	0.75	0.78
Mri16	CACGGCGTTGAGTTCCTAT R: ACCCAACTTGAACCCATCCG	(CA)7X5(ACA)10	60	183 - 351	17	0.81	0.84
Mri17	GTGGTAACCTGCAACTCCT R:AGACCCACAGAAAGGGGGT	(CAGT)5	60	249 - 309	7	0.74	0.78
Mri18	TTTCGGGTTCCCTTCCTC R: CGCGTAGCTTGTGTTACGG	(T)62CAGTCTT(TG)18	60	ANS	-	-	-

As ampliações dos 18 loci SSR foram realizadas conforme método proposto por Schuelke (2000). Neste método, os fragmentos gerados pelos pares de primers são marcados com fluoróforos durante a reação de PCR para que posteriormente possam ser separados por eletroforese capilar automatizada. Por esse motivo, uma cauda M13 (5' - TGTAACGACGGCCAGT-3') foi adicionada às extremidades 5' dos primers forward, cuja sequência também foi sintetizada separadamente e marcada com quatro corantes diferentes, 6-FAM, VIC, NED e PET, permitindo a leitura simultânea de quatro pares de primers para cada amostra.

As reações de amplificação foram ajustadas para um volume final de 10 µl contendo 4,5 µl de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 0,10 µl de primer forward (10 µM), 0,40 µl de primer reverse (10 µM), 0,40 µl de primer M13 (5 µM), marcado com um dos fluoróforos (6-FAM, VIC, NED, PET), 4 µl de DNA (10 ng/µl) e 0,60 µl de água livre de nuclease. As condições de ciclagem foram as mesmas para cada par de primers utilizados, com desnaturação inicial por 4 min a 95 °C; 5 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C e 30 s a 72 °C, com diminuição de 1 °C na temperatura de recozimento por ciclo; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C e 30 s a 72 °C; e uma extensão final de 10 min a 72°C.

As amostras amplificadas de cada par de primers marcadas com um dos corantes fluorescentes (6-FAM, VIC, NED e PET) foram combinadas em uma única mistura, composta por 2 µl de PCR cada. Em seguida, 1 µl da mistura, contendo quatro primers, foi adicionado a 0,2 µl de GeneScan™ 600 LIZ™ Dye Size. Um marcador de peso molecular padrão (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 8,8 µl de formamida HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) foram submetidos à eletroforese capilar em um sistema automatizado ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os alelos dos eletroferogramas foram gerados e determinados manualmente utilizando o software GeneMarker versão 2.6.3 (SoftGenetics, State College, PA, EUA).

2.5. Amplificação da região da calmodulina

Para amplificação da região do gene da calmodulina, foram realizadas reações de PCR utilizando 30 ng de DNA; 7,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA); 0,6 µM de iniciadores direto e reverso; 0,6 µL de DMSO (dimetilsulfóxido); e água ultrapura para um volume final de 15 µL. A região foi amplificada utilizando o par de primers CL1C (forward) e CL2C (reverse) (Weir et al., 2012), de acordo com as seguintes condições de ciclagem: uma desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguida por 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 52 °C e 1:30 min a 72 °C, concluindo com uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1% antes de serem purificados com acetato de amônio 7,5 M. O sequenciamento foi conduzido nas direções direta e reversa usando o kit de reação pronto para sequenciamento do ciclo BigDye® (Perkin-Elmer/Applied Biosystems) e o Analisador Genético ABI 3500 xL (Applied Biosystems).

2.6. Análise de dados SSR

Após a determinação dos alelos, os dados foram analisados quanto à presença de clones na amostra utilizando a função “clonecorrect” do pacote poppr v.2.9.3 (Kamvar et al., 2014; Kamvar et al., 2015) implementado no Ambiente R. 4.1.2 (Equipe Central R, 2021). O mesmo pacote foi utilizado para calcular o total de dados faltantes.

Para verificar a presença de estrutura clonal nos isolados analisados, após aplicação da função “clonecorrect”, foi calculado o índice de associação padronizado (rbarD) utilizando o pacote “poppr”, com 10.000 permutações para determinação de significância. Este índice estima a presença de desequilíbrio de ligação entre os locus analisados e é frequentemente utilizado para distinguir clonalidade e acasalamento em estudos genético populacionais de fungos, pois permite inferir associação não aleatória entre alelos em diferentes locus (Souza et al., 2010; Attanayake et al., 2014; Lawrence et al., 2015; Cabral et al., 2016; Serna-Domínguez et al., 2019b). Os valores de rbarD próximos de zero indicam equilíbrio de ligação, ou seja, presença de recombinação entre isolados. No entanto, os valores de rbarD diferem significativamente de zero, indicando a presença de desequilíbrio de ligação, ou seja, alelos de diferentes loci estão associados de forma não aleatória, uma característica da reprodução clonal.

Após a exclusão dos clones, o conteúdo de informação de polimórficos (PIC), gerado por cada par de primers, foi estimado utilizando o pacote polysat v.1.6 (Clark e Schreier, 2017). Foram estimados também utilizando o hierfstat v. 0,5-10 (Goudet e Jombart, 2021), o número de alelos gerados para cada par de primers (N_a), e a diversidade genética de Nei (H_s) destes (Nei, 1987).

Para identificar os grupos genéticos existentes entre os isolados de *M. rileyi*, foi realizada uma análise Bayesiana no software BAPS v.6.0 (Corander et al., 2008). Foram testados valores de $K = 1$ a $K = 25$ possíveis clusters (quatro K 's a mais que o número de locais de origem dos isolados) utilizando o anterior “Clustering of Individuals”. Esta abordagem bayesiana trata tanto o número de populações (locais) quanto a frequência alélica dentro delas como variáveis aleatórias. Como resultado, pode detectar subestruturas populacionais ocultas sem depender de informações populacionais (Corander et al., 2004). Esta abordagem permite

uma detecção mais precisa da estrutura genética (Latch et al., 2006; Wilkinson et al., 2011; Dejacó et al., 2016). A partir dos grupos genéticos encontrados foi realizada outra análise para verificar a possível mistura genotípica ancestral entre eles (Corander e Marttinen, 2006). Esta análise incluiu 5.000 iterações, com 500 indivíduos de referência por população e 500 iterações para cada indivíduo.

Após inferir os grupos genéticos para toda a amostra, a partição da variação genética dentro e entre os clusters foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) no software Arlequin v.3.5.1.3 (Excoffier et al., 1992), usando 10.000 permutações para confirmar a significância do teste. Apenas clusters constituídos por três ou mais isolados foram utilizados. Com base na AMOVA, os índices de fixação global e pareado (F_{ST}) foram calculados no mesmo software. Para avaliar as relações entre os isolados, uma Rede Mínima Spanning (MSN) foi construída usando o pacote poppr (Kamvar et al., 2014; Kamvar et al., 2015) implementado no ambiente R v.4.0.1 (R Core Team, 2021), usando a distância de Prevosti (Prevosti et al., 1975). Esta distância facilita estimativas eficientes mesmo com dados faltantes (Hansen et al., 2016; Kamvar et al., 2015).

Os índices de diversidade genética de cada cluster foram estimados através do número de alelos (N_a) e número médio de alelos (N_{am}), riqueza alélica rarefeita (R_a) e diversidade genética de Nei (H_s ; Nei, 1987), utilizando o pacote hierfstat v. 0.5-10 (Goudet e Jombart, 2021), implementado em R 4.1.2 (R Core Team, 2021). Os alelos efetivos médios (A_e) e o número de alelos privados (A_p) foram utilizados como parâmetros da diversidade genética dos clusters, tendo sido estimados pelo pacote poppr v.2.9.3 (Kamvar et al., 2014; Kamvar et al., 2014; Kamvar et al., 2014; Kamvar et al., 2015).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização de loci microssatélites

Os 18 pares de primers sintetizados apresentaram motifs perfeitos com três, quatro, cinco e seis nucleotídeos, além de motifs interrompidos e compostos (Tabela 2). Dezesesseis pares apresentaram amplificação satisfatória, com taxa média de amplificação de 94% (Figura 2), medida pela quantidade de dados faltantes, com exceção dos pares Mri9 e Mri18 que não amplificaram nenhuma amostra.

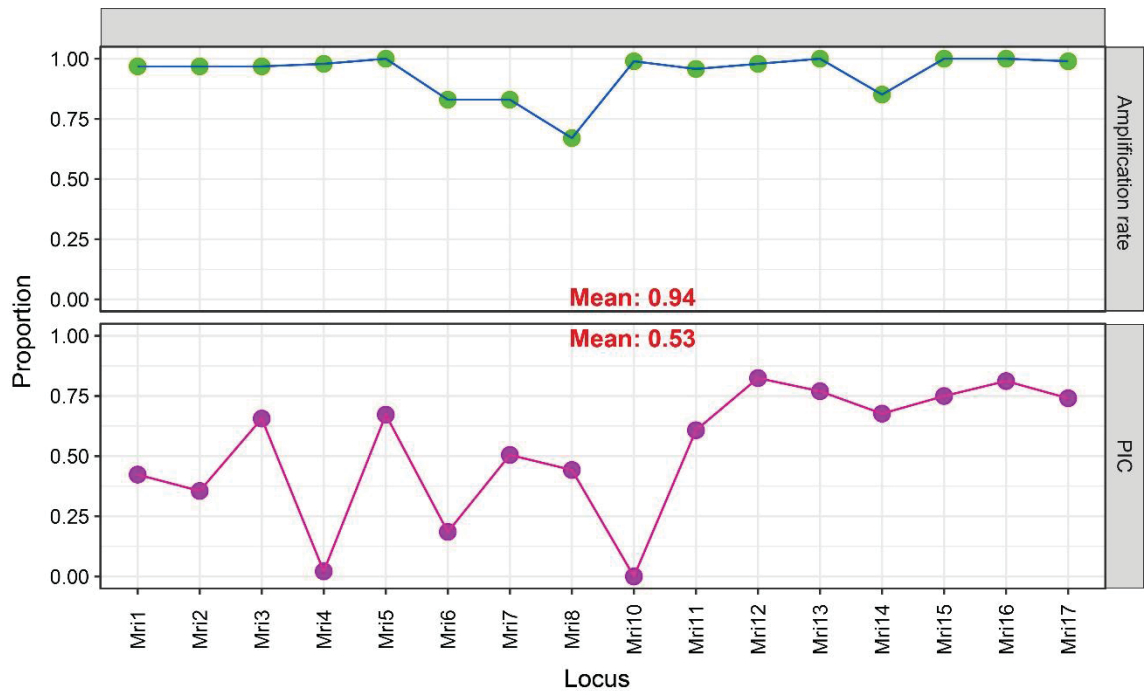


Figura 2. Eficiência de amplificação e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de 16 marcadores SSR de novo para *Metarhizium rileyi*.

Os 16 pares de primers geraram 126 alelos distintos, com média de 7,9 alelos por locus; entretanto, o locus Mri10 era monomórfico, apresentando apenas um alelo de 158 pb. Os 15 primers polimórficos produziram fragmentos variando em tamanho de 113 pb a 414 pb, com Mri4 apresentando o menor número de alelos (2), menor PIC (0,02) e menor Hs (0,02). Em contraste, Mri12 e Mri16 geraram 16 e 17 alelos, com PIC de 0,82 e 0,81 e Hs de 0,85 e 0,84, respectivamente. Segundo classificação de Botstein et al., (1980), dos 15 primers, 10 apresentaram alto teor de PIC, pois apresentaram valores acima de 0,50. O valor médio do PIC foi de 0,53, enquanto o valor médio do Hs foi de 0,56. As características individuais dos marcadores podem ser visualizadas na Tabela 2, e a eficiência e taxa de amplificação na Figura 2.

3.2. Diversidade e estrutura genética

Dos 136 isolados analisados, 43 foram identificados como clones com o SSR desenvolvido neste estudo, portanto, foram excluídos das análises de diversidade e estrutura genética (Tabela 1). Após a determinação dos agrupamentos genéticos, os pares de primers Mri16, Mri17 e Mri18 foram excluídos da análise, por apresentarem menor taxa de amplificação em determinados agrupamentos. As exclusões foram feitas para evitar qualquer viés nas inferências de diversidade e estrutura genética. Resultando em uma matriz final composta por 93 isolados (genótipos multilocus únicos) e 13 pares de primers, que identificaram 91 alelos

diferentes, considerando todas as amostras. A partir desta matriz, o teste de recombinação, realizado utilizando o índice de associação padronizado (r_{barD}), revelou uma estrutura clonal significativa ($r_{barD} = 0,25$; $p = 0,001$) nos isolados de *M. rileyi*.

A análise de mistura realizada utilizando o software BAPS, designou $K = 12$ como o número ideal de agrupamentos genéticos (Figura 2; verossimilhança marginal = -1040,5242). Após a análise, foi possível verificar uma mistura ancestral entre os aglomerados, e constatou-se que eles estavam isolados geneticamente (Figura 2). Estimativas de diversidade e estrutura genética foram feitas a partir dos 12 clusters. Os isolados que compõem cada um dos clusters estão listados na Tabela 1.

O cluster I foi formado por 19 isolados de diferentes localidades: Assis, SP; Planaltina, DF; Campos Novos dos Parecis, MT; Warta, PR; Província de Buenos Aires, AR; e Chivilcoy, Buenos Aires, AR, (Figura 3), a maioria dos isolados foram de *A. gemmatalis*. O segundo cluster é formado por 11 isolados de Warta, PR; Ponta Grossa, PR; Planaltina, DF; Oliveiros, Santa Fé e Buenos Aires, AR, com a maioria dos isolados também de *A. gemmatalis*. O Cluster III inclui 11 isolados, todos provenientes do estado do Paraná, PR, dez isolados de *A. gemmatalis* e apenas um de *C. includens*. Todos os quatro isolados do Cluster IV são do estado do Paraná, BR; entretanto, cada isolado é de um hospedeiro diferente (*C. includens*, *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e um hospedeiro não identificado). O Cluster V possui apenas 3 isolados sem relação aparente com o local de origem (Chivilcoy, AR; Warta, PR), mas ambos isolados de *A. gemmatalis*.

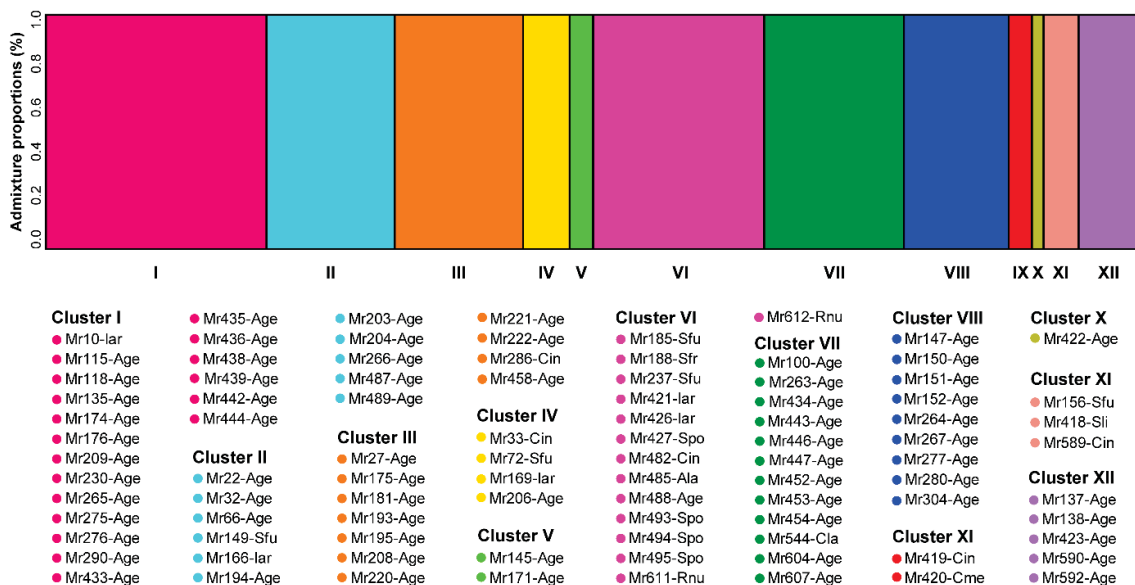


Figura 3. Análise bayesiana de 93 isolados de *Metarhizium rileyi* realizada pelo software BAPS, com base em 13 loci SSR. Menor probabilidade marginal (-1040,5242) encontrada para $K = 12$ clusters.

O Cluster VI é formado por 14 isolados obtidos de localizações geográficas muito distantes, oeste da Ásia (Sulawesi Selatan (Celebes), Indonésia ARSEF 558; Honiara Guadalcanal ARSEF-1879); Índia, México, Brasil (Warta-PR; Bela Vista do Paraíso, PR; Vilhena, RO) e Argentina (Buenos Aires, AR; Província de Santiago del Estero, AR), bem como isolados de hospedeiros de diferentes famílias, Noctuidae (*S. frugiperda*, *C. includens*, *Rachiplusia nu*), Erebidae (*A. gemmatalis*) e lagartas não identificadas, agrupando assim genótipos heterogêneos. O cluster VII é formado por 12 isolados obtidos de *A. gemmatalis* e um de *Chlosyne lacinia* (Nymphalidae). Na região de Londrina, onde a prevalência de *M. rileyi* pode ser alta e a especificidade do fungo pode ser diferente com alta pressão de inóculo, é possível a infecção de insetos hospedeiros incomuns, como *C. lacinia* com menor suscetibilidade, pois a prevalência em esta espécie é baixa.

O Cluster VIII é formado por 9 isolados, todos obtidos de *A. gemmatalis*, sendo a maioria da região de Planaltina, DF e um único isolado de Patos de Minas, localizado a 352 km de distância, indicando uma homogeneidade genética deste cluster. O Cluster IX, por sua vez, é formado por apenas 2 isolados, um de Plusiinae (ARSEF 1047 da Prefeitura de Fuchu Tóquio-Japão) e outro de um inseto da família Crambidae (ARSEF 1761, Los Baños, Manila, Filipinas), localizado em Leste e Sudeste Asiático, respectivamente. O Cluster X possui apenas um isolado da Indonésia e foi obtido do hospedeiro *Naranga* sp. (Arctiidae) praga do arroz. O Cluster XI é composto por 3 isolados não relacionados ao local de origem e hospedeiro (Brasília, DF, Brasil; ARSEF 1014 da Prefeitura de Fuchu Tóquio-Japão; Gainesville, FL, EUA) obtidos de *S. frugiperda*, *S. litura*, *C. includens*, respectivamente. Enquanto o cluster XII é formado por 5 isolados, todos do norte da Flórida, EUA e todos de *A. gemmatalis*.

A Minimum Spanning Network construída a partir da distância de Prevosti corroborou os clusters designados pela análise de cluster bayesiana (BAPS), exceto o cluster VIII, que pareceu estar dividido em dois subgrupos baseados em isolados do cluster III e (Figura 4). Nesta análise também é possível observar sobreposições entre os isolados, indicando a presença de genótipos muito semelhantes dentro dos clusters, como esperado para espécies com estrutura clonal.

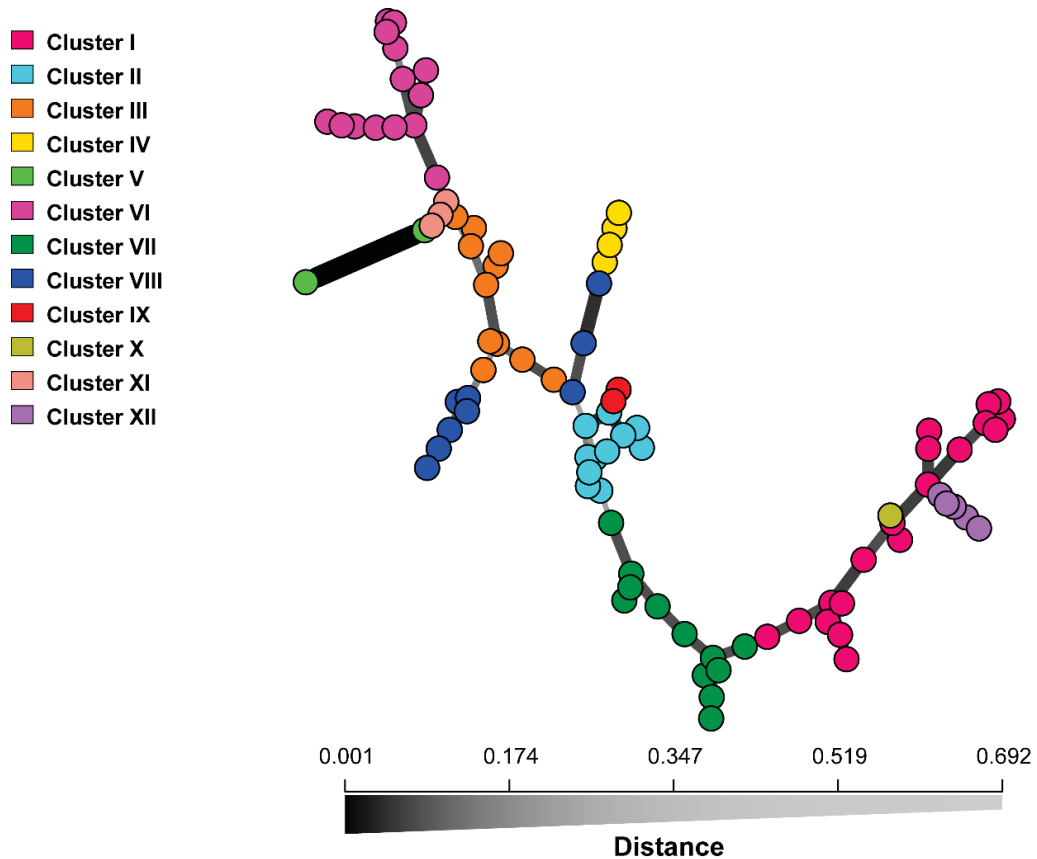


Figura 4. As relações entre 93 isolados de *M. rileyi*, com base em 13 loci microssatélites, são representadas em uma Minimum Spanning Network. Os pontos coloridos representam isolados do mesmo grupo genético atribuído pela análise de agrupamento bayesiano.

No estudo, a análise bayesiana não categorizou distintamente os clusters com base nos hospedeiros ou na origem geográfica. No entanto, certos agrupamentos abrangiam a maioria dos isolados que partilhavam uma origem geográfica comum. Por exemplo, o cluster VIII foi composto principalmente por isolados do Centro-Oeste do Brasil, o cluster II do Sul do Brasil e o cluster XII de Quincy, norte da Flórida, EUA. As regiões sub-representadas com poucos isolados das ilhas do Pacífico (Japão, Filipinas e Java) foram colocadas nos grupos IX e X. Para realizar uma análise mais abrangente das populações sub-representadas, é necessária uma amostragem intensiva numa escala geográfica mais ampla. A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para nove dos doze clusters identificados. Os Clusters V, IX e X foram excluídos da análise porque continham menos de três isolados. A partição da variação genética foi maior entre os diferentes clusters (67,43%) do que dentro deles (32,57%; Tabela 3), sendo o índice de diferenciação genética muito elevado ($F_{ST} = 0,67$), segundo classificação proposta por Hartl e Clark (2006).

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) para nove agrupamentos genéticos de *Metarhizium rileyi*.

Fonte de Variação	d.f.	SS	VC	PV (%)	F _{ST} global
Entre Clusters	8	194.09	2.44	67.43*	0.67*
Dentro dos clusters	79	93.00	1.18	32.57*	
Total	87	287.09	3.61		

d.f., degree of freedom; SS, sum of squares; VC, Variation components; PV, percentage of variation; F_{ST}, fixation index. * $P < 0.01$ (Significance test, 10 100 permutation).

Os valores de FST pareado, além de estatisticamente significativos ($p < 0,001$), foram geralmente elevados entre os clusters genéticos analisados, reforçando os resultados obtidos na AMOVA e no FST global. Entre os pares, os clusters I e VI apresentaram a maior diferenciação genética entre eles ($F_{ST} = 0,78$), enquanto os clusters II e VIII exibiram a menor diferenciação genética ($F_{ST} = 0,44$) (Tabela 4).

Tabela 4. Diferenciação pareada (FST) entre nove agrupamentos genéticos de *Metarhizium rileyi*.

	I	II	III	IV	VI	VII	VIII	XI	XII
Cluster I	0								
Cluster II	0.74	0							
Cluster III	0.72	0.53	0						
Cluster IV	0.73	0.55	0.59	0					
Cluster VI	0.78	0.71	0.72	0.67	0				
Cluster VII	0.46	0.63	0.69	0.68	0.76	0			
Cluster VIII	0.67	0.44	0.46	0.46	0.64	0.65	0		
Cluster XI	0.77	0.70	0.66	0.54	0.47	0.77	0.57	0	
Cluster XII	0.64	0.72	0.71	0.64	0.77	0.65	0.64	0.75	0

Os clusters V, IX e X foram removidos porque os estimadores de diversidade não podem ser calculados para esses clusters, pois o número de isolados foi inferior a três.

Quanto aos estimadores de diversidade genética, assim como no AMOVA, foram calculados para nove dos 12 clusters identificados, devido à presença de menos de três isolados nos clusters V, IX e X. O número de alelos variou de 18 para o cluster XII ($N_{am} = 1,38$) a 26 para o cluster III ($N_{am} = 2,00$) (Tabela 5). Entretanto, o maior número de alelos efetivos (A_e) (número de alelos distintos que realmente contribuem para a variabilidade genética da população) foi encontrado no cluster IV ($A_e = 1,72$), enquanto o menor foi observado no cluster I e no cluster VII ($A_e = 1,26$). A riqueza alélica (R_a) variou de 1,15 para o cluster I a 1,41 para o cluster IV, enquanto o menor índice de diversidade genética Nei (H_s) foi observado no cluster I ($H_s = 0,15$) e o maior índice no cluster IV ($H_s = 0,41$). O número de alelos privados variou de 2 para os clusters VII e XII a 9 para os clusters VI (Tabela 5). Dada a significativa estrutura clonal observada em *M. rileyi*, a presença destes alelos é provavelmente devida ao acúmulo de

mutações ao longo do tempo, destacando a composição genética heterogênea e diferenciada dos clusters identificados.

Tabela 5. Parâmetros de diversidade genética estimados para 12 agrupamentos genéticos de *Metarhizium rileyi*.

	N	Na	Nam	Ae	Ra	Ap	Hs
Cluster I	19	24	1.85	1.26	1.15	4	0.15
Cluster II	11	20	1.54	1.35	1.18	3	0.18
Cluster III	11	26	2.00	1.35	1.20	5	0.20
Cluster IV	4	24	1.85	1.72	1.41	6	0.41
Cluster VI	14	24	1.85	1.47	1.19	9	0.19
Cluster VII	12	22	1.69	1.26	1.17	2	0.17
Cluster VIII	9	25	1.92	1.53	1.30	3	0.30
Cluster XI	3	19	1.46	1.42	1.39	8	0.38
Cluster XII	5	18	1.38	1.31	1.18	2	0.18

N, número de isolados por cluster; Na, número de alelos por cluster; Nam, número médio de alelos; Ae, média de alelos efetivos; Ra, rarefação da riqueza alélica; Ap, alelos privados; Hs, diversidade genética de Nei (Nei, 1987). Os clusters V, IX e X foram removidos da Tabela 5, pois os estimadores de diversidade não podem ser calculados para esses clusters, pois o número de isolados foi inferior a três.

3.3. Diversidade de um fragmento do gene da calmodulina de *M. rileyi*

O sequenciamento parcial do gene da calmodulina (número de acesso GenBank OR683161 - OR683253) foi obtido para 93 isolados, cujo comprimento foi de 758 pb, sem nenhum evento InDel. Foram observadas apenas duas substituições, que, segundo o método de parcimônia estatística utilizado pelo software TCS, constituíram três haplótipos diferentes (H1, H2 e H3), formando uma rede com 95% de confiabilidade na conectividade entre os haplótipos (Figura 5).

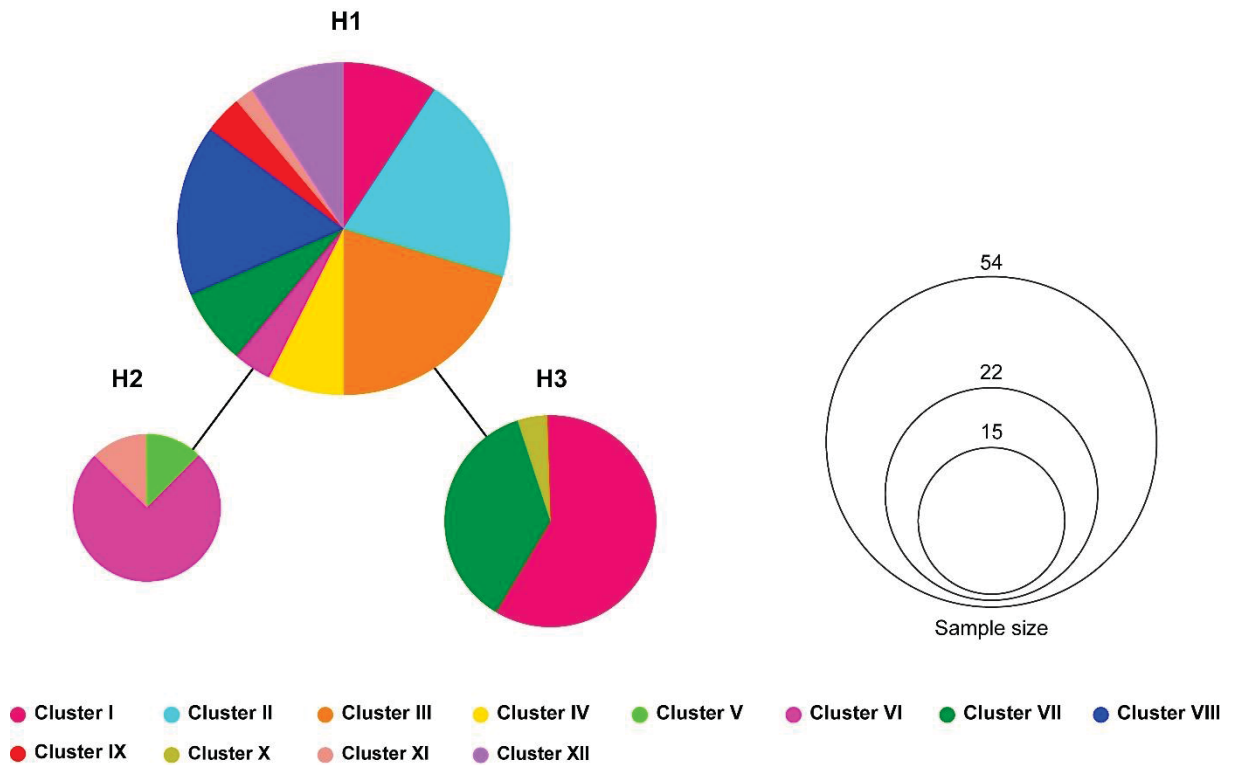


Figura 5. Rede de haplótipos para 93 isolados de *Metarhizium rileyi*, construída pelo método de parcimônia no software TCS com base em sequências parciais do gene da calmodulina.

O haplótipo H1 teve o maior peso do grupo externo (0,83) reunindo a maioria dos isolados (54); portanto, foi considerado o mais ancestral. Tal haplótipo foi encontrado em 10 dos 12 agrupamentos genéticos, estando ausente apenas nos cluster V e X. Os haplótipos H2 e H3 foram derivados do haplótipo mais ancestral. O haplótipo H2 esteve presente nas amostras dos clusters V, VI e XI, enquanto o haplótipo H3 foi encontrado nos clusters I, VII e X. Apenas os clusters I, VI, VII e XI apresentaram dois haplótipos, os outros tinham apenas um.

4. DISCUSSÃO

Metarhizium rileyi é um fungo entomopatogênico amplamente distribuído, especialista em lepidópteros (Suwannakut et al., 2005). Apesar de sua ampla distribuição, as colônias dos isolados de *Metarhizium rileyi* apresentam consistentemente a mesma cor, bem como as mesmas características macro e micromorfológicas (Boucias et al., 2000b). Os marcadores microsatélites desenvolvidos neste estudo fornecem o nível de resolução necessário para compreender sua variação genética e estudar a estrutura genética.

A diversidade genética dentro desta espécie foi avaliada usando vários métodos, incluindo marcadores RAPD (Boucias et al., 2000b), marcadores AFLP (Boucias et al. 2000a; Suwannakut et al., 2005; Devi et al., 2007) e ISSR (Han et al., 2002; Zhang, et al., 2016).

Estudos com marcadores ISSR em isolados, principalmente amostrados em uma ampla área geográfica na China, revelaram, em alguns desses casos, que a seleção de habitat influencia vagamente a estrutura populacional deste fungo (Zhang et al., 2016). A mesma tendência foi observada por Boucias et al., (2000a; 2000b) considerando a localização geográfica e seus hospedeiros (Tigano e Aljanabi, 2000; Suwannakut et al., 2005). Nenhuma associação entre distância genética e geográfica foi relatada por outros autores (Han et al., 2002; Zhang et al., 2016).

Em uma escala geográfica mais restrita, estudos envolvendo epizootias naturais de *M. rileyi* e marcadores AFLP diferenciaram com sucesso a composição genotípica dentro da onda epizootica (Boucias et al., 2000a). Boucias et al. (2000a) relataram que um haplótipo prevalente de um único local (Quincy, FL) infectou *A. gemmatalis*, *C. includens* e *P. scabra*. Além disso, os genótipos individuais são persistentes ao longo das estações e anos, o haplótipo mais frequente coletado em 1993 permaneceu dominante nos anos sucessivos de 1993 e 1998 (Boucias et al., 2000a).

A amplificação de microssatélites, realizada neste estudo com os mesmos isolados coletados por Boucias et al. (2000a) também diagnosticaram haplótipos AFLP (CNPSo138, CNPSo155; CNPSoMr591, CNPSoMr593, CNPSoMr594) (Tabela 1). Da mesma forma, o isolamento do mesmo clone (CNPSoMr166...CNPSoMr284) presente em diferentes espécies de lagartas foi realizado no sítio Warta (PR) durante 1999, conforme relatado por Boucias et al. (2000a) e Zhang et al., (2016) um único haplótipo pode infectar diferentes espécies. Em contraste, Devi et al. (2007) detectaram uma maior diversidade genética entre haplótipos de *M. rileyi* usando ISSR durante uma epizootia de 40 dias em *Spodoptera litura* em *Andhra Pradesh*, na Índia.

Estudos realizados com microssatélites sobre um patógeno específico de Acrididae, *M. acridum*, revelaram que a diversidade genética média foi de 0,226, variando de 0,074 a 0,275. No entanto, está baixa diversidade genética pode ser atribuída à amostragem limitada num único ano e região geográfica (Serna-Domínguez et al., 2019a). Em uma amostragem mais extensa em diversas latitudes, a diversidade genética de *M. anisopliae*, que possui uma gama de hospedeiros, foi medida em 0,27 usando SSR (Becerra Velasquez et al., 2007). Valores semelhantes de diversidade genética foram obtidos por Zhang et al. (2016) com ISSR para isolados chineses de *M. rileyi* infectando bichos-da-seda, sugerindo que a diversidade genética desta espécie é baixa (0,25). Os marcadores SSR são mais informativos que os marcadores ISSR, por serem codominantes, enquanto os ISSRs são dominantes. Os marcadores dominantes são bialélicos e tendem a sofrer co-migração de bandas, o que pode interferir na homologia

entre fragmentos. Por outro lado, os SSRs são multialélicos, apresentando alto nível de conteúdo de informação polimórfica e reprodutibilidade, proporcionando maior resolução (Goldstein e Schlotterer, 1999; Oliveira et al. 2006; Durigan et al., 2018).

Populações clonais de fungos entomopatogênicos foram observadas em fungos com uma ampla gama de hospedeiros, como *Batkoa major* (Gryganskyi et al 2022), ou com uma gama restrita de hospedeiros com clones associados a espécies hospedeiras (Gryganskyi et al 2013), ou amostrados no solo (Rehner, 2020). No presente trabalho, os clones foram encontrados com maior frequência em locais geograficamente restritos, como Warta e Planaltina, durante a mesma ou diferentes estações do ano (Tabela 1). Esta redundância clonal pode surgir da dominância local de genótipos clonais, ou pode ser atribuído a uma amostragem mais frequente e consistente. Embora a amplificação e sequenciamento direto por PCR possam servir como um método rápido para detectar haplótipos, sequências amplificadas conhecidas de *M. rileyi* não exibiram variabilidade suficiente para resolver diferenças intraespecíficas. A análise da sequência da região ITS1-5.8s-ITS2 e do rDNA mitocondrial SSU revelou sequências idênticas (Boucias et al., 2000b; Sosa-Gómez et al., 2009), e resultados semelhantes foram observados na região beta-tubulina, que é muito conservado para exibir variabilidade intraespecífica (Han et al., 2002). Da mesma forma, a sequência parcial do gene da calmodulina tem uma variabilidade demonstrável demasiado baixa para realizar análises intraespecíficas.

5. CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites desenvolvidos para *M. rileyi* fornecem resolução suficiente para distinguir diferentes genótipos e clones. Isolados obtidos durante epizootias na região central do Brasil (Planaltina, estado de Goiás), Warta no estado do Paraná (região Sul) e Quincy, centro-norte da Flórida, EUA, pertencem a haplótipos prevalentes (clones) e haplótipos de menor ocorrência. Esta descoberta pode ter implicações para a caracterização e desenvolvimento de agentes de controle microbiano. A descoberta desses primers microssatélites pode acelerar os esforços para identificar e rastrear cepas específicas de fungos após a liberação para induzir epizootias. Também pode auxiliar no registro adequado junto às agências reguladoras e verificar a persistência ou introgressão com genótipos locais.

REFERÊNCIAS

- Allen, G. E., Greene, G. L., Whitcomb, W. H., 1971. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* in Florida. **Florida Entomologist**, v. 54, p. 189–191.
- Attanayake, R. N., Tennekoon, V., Johnson, D. A., Porter, L. D., Del Río-Mendoza, L., Jiang, D., Chen, W., 2014. Inferring outcrossing in the homothallic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* using linkage disequilibrium decay. **Heredity**, v. 113, p. 353-63.
- Becerra Velásquez, V., Paredes Cárcamo, M., Rojo Meriño, C., France Iglesias, A., Franco Durán, J., 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 89-99.
- Binneck, E., Lastra, C. C. L., Sosa-Gómez, D. R., 2019. Genome sequence of *Metarhizium rileyi*, a microbial control agent for Lepidoptera. **Microbiolxx. Resourxx. Announcxx**, v. 8.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331.
- Boucias, D. G., Schoborg, E. A., & Allen, G. E., 1982. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p.238-240.
- Boucias, D. G., Stokes, A., Suazo, J. Funderburk, J., 2000a. AFLP analysis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, v. 92, p. 638-648.
- Boucias, D. G., Tigano, M.S., Sosa-Gómez, D.R., Glare, T.R., Inglis, P.W., 2000b. Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Biological control**, v.19, p. 124-138.
- Cabral, P. G. C., Maciel-Zambolim, E., Oliveira, S. A. S., Caixeta, E. T., Zamobolim, L., (2016) Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. **Plant Pathology**, v. 65, p. 196-204. [https://doi: 10.1111/ppa.12411](https://doi.org/10.1111/ppa.12411)
- Clark, L.V., Schreier, A. D., 2017. Resolving microsatellite genotype ambiguity in populations of allopolyploid and diploidized autopolyploid organisms using negative correlations between allelic variables. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, p. 1090-1103.
- Corander, J., Marttinen, P., 2006. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 2833–2843.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., Tang, J., 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 539.
- Corander, J., Waldmann, P., Marttinen, P., Sillanpää, M.J. 2004., BAPS 2: Enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2363–2369.

- Corrêa-Ferreira, B. S., Smith, J. G., 1975. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner in Paraná. **Florida Entomologist**, v. 58, p. 280.
- Dejaco, T., Gassner, M., Arthofer, W., Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., 2016. Taxonomist's Nightmare ... Evolutionist's Delight: an integrative approach resolves species limits in jumping bristletails despite widespread hybridization and parthenogenesis. **Systematic Biology**, v. 65, p. 947–97.
- Devi, K. U., Murali Mhan, C. H., Padmavathi, J. Ramesh, K., 2003. Susceptibility to fungi of cotton bollworms before and after a natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). **Biocontrol Science and Technology**, v.13, n.3, p. 367-371.
- Devi, K. U., Reineke, A., Rao, U. C. M., Reddy, N. R. N., Khan, A. P. A., 2007. AFLP and single-strand conformation polymorphism studies of recombination in the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Mycological Research.**, v.111, p. 716-725.
- Durigan, M., Cardoso-Silva, C. B., Ciampi-Guillardi, M.; Toledo-Silva, G., Mori, G. M., Franco, R.M.B. Souza, A. P. 2018. Molecular genotyping, diversity studies and high-resolution molecular markers unveiled by microsatellites in *Giardia duodenalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, p. e0006928.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479–491.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v.1, p. 47–50.
- Firake, D.M., Behere G.T., 2020. Natural mortality of invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize agroecosystems of northeast India. **Biological control**, p. 148. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104303>
- Goldstein, D.B. and Schlotterer, C. Microsatellites: Evolution and applications. Oxford: **Oxford University Press**. 1999.
- Goudet, J., Jombart, T., 2021. HIERFSTAT: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics. R package version 0.5-10, 2021. <https://CRAN.R-project.org/package=hierfstat>. (Accessed 22 November 2022).
- Gryganskyi, A. P., Golan, J., Hajek, A. E., 2022. Season-long infection of diverse hosts by the entomopathogenic fungus *Batkoa major*. **Plos one**, v. 17, n. 5, p. e0261912.
- Gryganskyi, A. P., Humber, R. A., Stajich, J. E., Mullens, B., Anishchenko, I. M., Vilgalys, R., 2013. Sequential utilization of hosts from different fly families by genetically distinct, sympatric populations within the *Entomophthora muscae* species complex. **Plos one**, v. 8, n. 8, p. e71168.
- Han, Q., Inglis, G. D., Hausner, G., 2002. Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, as revealed by partial β -tubulin sequences and

inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 376-383.

Hansen, Z. R., Everts, K. L., Fry, W. E., Gevens, A. J., Grünwald, N. J., Gugino, B. K., Johnson, D. A., Johnson, S. B., Judelson, H. S., Knaus, B. J., Mcgrath, M. T., Myers, K. L., Ristaino, J. B., Roberts, P. D., Secor, G. A., Smar, C. D., 2016. Genetic variation within clonal lineages of *Phytophthora infestans* revealed through genotyping-by-sequencing and implications for late blight epidemiology. **Plos One**, v.11, n.11, p.e0165690.

Hartl, D. L., Clark, A.G., 2006. Principles of Population Genetics. 4th edn. Sunderland: Sinauer Associates.

Humber, R. A., 2014. USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures ARSEF: Catalog of Strains. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, DC 608pp.

Ignoffo, M. C., 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide, pp. 513-538. In H. D. Burges [ed.] Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980. Academic Press, New York.

Ingle, Y.V., Aherkar, S.K., Lande, G.K., Burgoni, E.B., Autkar, S.S., 2004. Natural epizootic of *Nomuraea rileyi* on lepidopterous pests of soybean and green gram. **Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 15, n. 2, p. 160-162.

Kamvar, Z.N., Brooks, J.C., Grünwald, N.J., 2015. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. **Front Genet**, v. 6, p. 208.

Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., Grünwald, N.J., 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **Peer J**, v. 2, p. e281.

Latch, E.K., Dharmarajan, G., Glaubitz, J.C., Rhodes, O.E., 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 295–302.

Lawrence, D.P., Travadon, R., Baumgartner, K., 2015. Diversity of *Diaporthe* species associated with wood cankers of fruit and nut crops in northern California. **Mycologia**, v. 107, p. 926 – 940.

Manjula, K., Nagalingam, B., Arjuna, R.P., 2003. Occurrence of *Nomuraea rileyi* on *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera* in Guntur District of Andhra Pradesh. **Annals of Plant Protection Sciences.**, v.11, p. 224- 227.

Moscardi, F., Kastelic, J. G., Sosa-Gómez, D.R., 1992. Susceptibility of three species of Lepidoptera associated with soybean to three isolates of the fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. An. Soc. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 21, p. 93-100.

Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
Oliveira, E.J.; Pádua, J.G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky, R.; Vieira, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p, 294-307, 2006.

Prevosti, A., Ocana, J., Alonso, G., 1975. Distances between populations of *Drosophila subobscura*, based on chromosome rearrangement frequencies. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 45, p. 231–241.

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://cloud.r-project.org/bin/windows/base/old/4.1.2>. (Accessed 22 November 2022).

Rehner, S.A. 2020. Genetic structure of *Metarhizium* species in western USA: Finite populations composed of divergent clonal lineages with limited evidence for recent recombination. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 177, p. 107491.

Rogers, S.O., Bendich, A.J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A., Verma, D.P.S, editors. *Plant Molecular Biology Manual*, v.6. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, p. 1–10.

Sánchez-Peña, S., 2010. Natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson infecting *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Coahuila México. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 43, p.7-8.

Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology** v. 18, p. 233-234.

Shang Y, Xiao G, Zheng P, Cen K, Zhan S, Wang C., 2016. Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1374-87.

Serna-Domínguez M. G., Andrade-Michel G. Y., Rosas-Valdez R., Castro-Félix P., Arredondo-Bernal H.C., Gallou, A., 2019a Genetic diversity of the *Metarhizium anisopliae* complex in Colima, Mexico, using microsatellites. **Fungal Biology**, v. 123, p. 855-863

Serna-Domínguez, María G., Andrade-Michel, Gilda Y., Rosas-Valdez, R., Castro-Félix, P., Arredondo-Bernal, H.C., Gallou, A., 2019b. High genetic diversity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in Colima, Mexico. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 163, p. 67–74.

Sosa-Gómez D. R., Humber R. A., Hodge K. T., Binneck E., da Silva-Brandão K. L., 2009. Variability of the mitochondrial SSU rDNA of *Nomuraea* species and other entomopathogenic fungi from Hypocreales. **Mycopathologia**, v. 167, n. 3, p. 145-54

Sosa-Gómez, D. R., López Lastra, C. C., Humber, R. A. 2010. An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brasil. **Mycopathologia**, v. 170, p. 61–76.

Sosa-Gómez, D. R., da Silva, J. J., 2002. In: Soja, E. (Ed.), Documentos 188: Fungos Entomopatogênicos: Catálogo de Isolados. EMBRAPA, Londrina, PR, p. 32.

Souza, E. A., Camargo Jr, O. A., Pinto, J. M. A., 2010. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1759 – 1769.

- Suwannakut, S., Boucias, D. G., Wiwat, C., 2005. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, p. 169–176.
- Thiel, T., Michalek W, Varshney R, Graner A., 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 411-422.
- Tigano, M.S., Aljanabi, S., 2000. RAPD analysis of *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, p. 240–242
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G., 2012. Primer3—New capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115.
- Wilkinson, S., Haley, C., Alderson, L., Wiener, P. 2011. An empirical assessment of individual-based population genetic statistical techniques: application to British pig breeds. **Heredity**, v. 106, p. 261–269.
- Zhang, S., Chen, X., Luan, F., He, L., Pu, S., Li, Z., 2016. Genetic diversity and population structure of the Chinese fungus *Metarhizium rileyi* causing green muscardine in silkworm. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 140, p. 16–24.

CAPÍTULO 3. A PLANTA HOSPEDEIRA INFLUÊNCIA A VIRULÊNCIA DO FUNGO *Metarhizium rileyi*?

RESUMO

O aumento do uso de bioinseticidas, notadamente os formulados com fungos entomopatogênicos, destaca-se no Manejo Integrado de Pragas (MIP). Porém, pouco se sabe sobre a complexa interação entre plantas, insetos herbívoros e fungos entomopatogênicos, assim, este trabalho teve como objetivo explorar a relação entre o substrato alimentar e o fungo *Metarhizium rileyi*, investigando, se a alimentação das lagartas de *Helicoverpa armigera* e *Chrysodeixis includens* afetam a virulência do fungo e a seleção de isolados específicos. As lagartas de ambas as espécies foram criadas em folhas de soja, algodão e dieta artificial, sendo separadas em grupos distintos. Após três gerações, lagartas do segundo instar foram transferidas para recipientes plásticos para montagem dos bioensaios. As lagartas foram infectadas pela exposição aos discos foliares tratados com o fungo, permitindo a aquisição da dose do fungo pelas lagartas. A análise comparativa dos níveis de mortalidade considerou tanto a planta em que o inseto foi criado quanto a planta no momento da infecção, revelando a significativa influência do substrato alimentar na virulência dos isolados de *M. rileyi*. Empregando a estimativa de Kaplan-Meier para analisar a sobrevivência das lagartas expostas aos isolados de *M. rileyi* nos diferentes substratos alimentares, resultou que o isolado Mr27 se destacou na redução da sobrevivência das lagartas em diversos substratos, sendo mais eficaz em folhas de algodão. A análise comparativa entre as espécies de lagartas e os substratos, ressalta a influência significativa que pode apresentar a cultura sobre a qual se aplica controle microbiano com *M. rileyi*. Este estudo contribui para uma compreensão mais aprofundada das interações tritróficas, sugerindo que a escolha do substrato alimentar pode ser crucial na seleção de isolados promissores para o desenvolvimento de bioinseticidas mais eficazes no MIP em diferentes contextos agrícolas.

Palavras-chave: Interações planta-inseto; fungo entomopatogênico; alimentação.

DOES THE HOST PLANT INFLUENCE THE VIRULENCE OF THE FUNGUS *Metarhizium rileyi*?

ABSTRACT

The use of bioinsecticides, notably those formulated with entomopathogenic fungi, stands out in the Brazilian agricultural Integrated Pest Management (IPM). However, little is known about the complex interaction among plants, herbivorous insects, and entomopathogenic fungi. Therefore, this work studies the relationship between the food substrate and the disease caused by *Metarhizium rileyi*, on *Helicoverpa armigera* and *Chrysodeixis includens*. Groups of both species were fed on soybean leaves, cotton, and artificial diet. After three generations, second-instar caterpillars were transferred to plastic containers to set up bioassays. The caterpillars were infected by exposure to leaf discs treated with the fungus, the comparative analysis of mortality levels considered both the plant on which the insect was reared and the plant at the time of infection, revealing the significant influence of the food substrate on the virulence of *M. rileyi* isolates. Using the Kaplan-Meier estimate to analyze the survival of caterpillars exposed to *M. rileyi* isolates on different food substrates, it resulted that the isolate Mr27 stood out in reducing the survival of caterpillars on different substrates, being more effective on cotton leaves. The comparative analysis between caterpillar species and substrates highlights the significant influence of the food substrate on the virulence of *M. rileyi* isolates. This study contributes to a deeper understanding of tritrophic interactions, suggesting that the choice of food substrate may be crucial in the selection of promising isolates for the development of more effective bioinsecticides in IPM in different agricultural contexts.

Keywords: Plant-insect interactions; entomopathogenic fungus; food.

1. INTRODUÇÃO

O avanço notável no desenvolvimento de bioinseticidas e o aumento do controle microbiano no Manejo Integrado de Pragas (MIP) têm se destacado no contexto agrícola atual, alcançando êxitos significativos, embora também enfrentem desafios desde a validação do desempenho no campo até a comercialização desses agentes. Dentro do contexto dos bioinseticidas formulados com fungos entomopatogênicos, ressalta-se, que a eficácia é sensivelmente influenciada por fatores ambientais, como radiação solar, temperatura e umidade (Jackson, Dunlap & Jaronski, 2009; Rajula et al., 2021).

Além desses fatores, torna-se relevante considerar outras interações que podem influenciar a atuação desses entomopatogênicos em campo, particularmente a interação entre plantas e insetos herbívoros alvo de controle. As plantas possuem variações intra e interespecífica, e essas variações podem exercer uma influência no desenvolvimento dos insetos herbívoros, impactando diretamente a taxa de crescimento populacional e os padrões alimentares desses insetos (Inbar & Gerling, 2008; Johnson, 2008; Lacey et al., 2001).

Outras características da planta, como a morfologia das folhas podem afetar a persistência dos fungos no filoplano até serem adquiridos por um inseto, e a composição química das folhas também podem influenciar o sistema imunológico do inseto, como a produção de enzimas e compostos metabólicos, afetando sua suscetibilidade a microrganismos (Inyang et al., 1998; Gillespie et al. 2000; Inglis et al., 2004), todas essas características, destacam a complexidade dessas interações, sugerindo que as plantas uma vez que são consideradas a alimentação dos insetos-praga podem não só afetar a sobrevivência desses insetos como também afetar os entomopatógenos.

Entretanto, no contexto específico dos fungos entomopatogênicos, a interação com os substratos alimentares dos insetos-praga, representados pelas plantas, constitui um campo de pesquisa pouco explorado. É conhecido que *Metarhizium rileyi* destaca-se como agente relevante para o controle biológico de lepidópteros pragas, exibindo ampla variabilidade genética e adaptação a diferentes ambientes (Allen et al., 1971; Ignoffo & Boucias, 1992; Faria et al., 1993; Sosa-Gómez; López; Humber, 2010). Este fungo ocorre com grande prevalência durante períodos de alta umidade, provocando epizootias em várias culturas, como em soja e algodão e conseqüentemente, reduzindo as populações de lagartas desfolhadores (Jin et al., 1978; Costa et al., 2015). Contudo, permanece desconhecida a influência do substrato alimentar na ação desse fungo. Estudos, como o de Ferrari et al. (2003), sobre a tolerância do pulgão *Acyrtosiphon pisum* ao fungo *Pandora neoaphidis*, enfatizam a influência da alimentação por

diferentes plantas, na ação do fungo. Csikos et al. (1999) demonstraram que em *Manduca sexta* L., as proteínas da cutícula variam de acordo com o substrato alimentar, indicando uma interação metabólica íntima e contínua com múltiplos sistemas de órgãos dos insetos. Dessa forma, se as plantas (substrato alimentar) forem de baixa qualidade ou alterarem a qualidade, por exemplo, através da produção de inibidores de protease, a cutícula será mais fina e, conseqüentemente, mais vulnerável ao ataque dos fungos entomopatogênicos.

Por essas razões a compreensão dessas interações pode fornecer algumas respostas sobre o motivo pelo qual alguns entomopatógenos têm sucesso variável como agentes de controle biológico, permitindo o desenvolvimento de estratégias de manejo de pragas mais eficazes. Assim, este trabalho tem como objetivo explorar a relação entre o substrato alimentar e o fungo *M. rileyi*, investigando se o substrato de alimentação das lagartas de *H. armigera* e *C. includens* afetam o processo de infecção e a ação de isolados específicos, contribuindo para uma compreensão mais profunda e eficaz das interações entre plantas, insetos herbívoros e entomopatogênicos no contexto do controle biológico de pragas agrícolas.

1. MATERIAL E METODOS

2.1. Criação massal de *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*

Espécimenes de *C. includens* e *H. armigera* foram criadas individualmente em recipiente plástico transparente (50mL) contendo aproximadamente 10 mL de dieta artificial (Greene et al. 1976), até a fase de pupa. As pupas foram transferidas para gaiolas de acrílico (30 cm de diâmetro e 40 cm de altura, até a emergência dos adultos). Os adultos eram alimentados com algodão embebidos com solução de mel à 10% e internamente as gaiolas eram forradas com papel sulfite como substrato para oviposição e. A criação foi mantida em sala climatizada a 25°C, umidade relativa de 70±10% e fotofase de 12 horas.

Os ovos foram coletados das gaiolas a cada três dias e transferidas inicialmente para um recipiente plástico transparente (500 mL), contendo aproximadamente 50 mL de dieta artificial, as lagartas foram individualizadas após dez dias ao atingirem o terceiro instar, momento de realização dos bioensaios.

2.2. Obtenção do fungo entomopatogênico

Os isolados de *M. rileyi* (n=5) foram selecionados a partir da coleção de culturas da Embrapa Soja (Sosa-Gómez & Silva, 2002), coletados entre 1990 e 2018 (Tabela 1). A multiplicação dos isolados fúngicos foi realizada inoculando os conídios dos fungos preservados em sílica gel sobre meio SMAY (Sabouraud-maltose-ágar mais extrato de levedura, constituído por maltose 4%, neopeptona 1%, extrato de levedura 1%, ágar 1,5%), e mantidos em estufa do tipo B.O.D em temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante 12 dias (ALVES, 1998).

A fim de selecionar o melhor isolado do fungo *M. rileyi*, testaram-se cinco isolados para o controle das espécies *H. armigera* e *C. includens* (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos cinco isolados de *Metarhizium rileyi* (nome, hospedeiro local, ano de coleta).

Isolados	Hospedeiro	Local	Ano
Mr 27	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1990
Mr 141	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Quincy, FL, USA	1993
Mr 304	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999
Mr 557	<i>Chlosyne lacinia</i>	Warta, PR, Brasil	2007
Mr 604	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Vilhena, RO, Brasil	2018

2.3. Plantas hospedeiras

Os cultivares de soja (BRS 284) e algodão (BRF 370 RF) hospedeiras das lagartas *C. includens* e *H. armigera*, foram cultivadas em casa de vegetação. A semeadura foi realizada em vasos plásticos de 3 L contendo uma mistura de terra, areia e esterco curtido na proporção 3:2:2 e um total de quatro plantas por vaso. Em todos os experimentos,

2.4. Bioensaios

As duas espécies *C. includens* e *H. armigera* foram criadas em folhas de soja e algodão até a terceira geração, separando-as em grupos. Grupo 1- Lagartas criadas em folhas de algodão, grupo 3° lagartas criadas em folíolos de soja e população 3° grupo lagartas criadas em uma dieta artificial de Greene et al (1976), a dieta era livre de antibiótico, metilparabeno e formol (Hoffmann et al., 1985). As folhas eram trocadas diariamente até as lagartas completarem seu ciclo. Após três gerações, lagartas do 3° instar das duas espécies foram transferidas individualmente para recipientes plásticos para bioensaios (bandejas de PVC com 32 células

(Advento do Brasil, Diadema, SP) no fundo de cada célula foi colocado papel filtro umedecido e um disco de folha das respectivas culturas (algodão e soja) mais o tratamento com dieta artificial. Com auxílio de uma pipeta foi adicionando 50 µl da suspensão fúngica na concentração de 1×10^6 sobre a superfície da dieta e dos discos de folhas, totalizando 180 discos (1,76cm Ø) de folha de cada planta. As suspensões dos conídios continham água e Tween 80 ao 0,1%. O tratamento controle foi água com Tween 80. Nesse caso, os insetos foram infectados pela exposição a discos foliares já tratados com o fungo, de modo que as lagartas tiveram que adquirir a dose do fungo no disco foliar. Assim, os níveis de mortalidade foram comparados dependendo da planta em que o inseto foi criado e também da planta no momento da infecção.

2.5. Análise de sobrevivência

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x6, sendo três substratos (1-Dieta artificial, 2-Soja e 3-Algodão), cinco isolados e uma testemunha (1- controle, 2- Mr 604, 3- Mr 141, 4- Mr 304, 5- Mr 27 e 6-Mr 557), 16 sub amostras com quatro repetições no tempo.

As avaliações foram realizadas diariamente após três dias da inoculação, registrando o número de lagartas mortas. Na análise de sobrevivência, a variável resposta é em geral o tempo de ocorrência de um evento de interesse, que nesse caso foi a morte das lagartas. Para confirmação da mortalidade pelo patógeno, os insetos foram lavados em álcool 70% por dez segundos e enxaguados em água destilada estéril por duas vezes durante 20 segundos para descontaminação externa, em seguida, os insetos foram acondicionados em placas de Petri com um algodão úmido por 5 dias, tornando possível a visualização da extrusão do patógeno (confirmação da infecção), ou não.

2.6. Análise estatística

A combinação dos tratamentos substratos e isolados, nesse experimento, podem interferir no tempo de sobrevivência das lagartas. Os resultados foram codificados como: 0-lagartas vivas, 1- lagartas mortas pelo tratamento e 2- lagartas mortas por causas desconhecidas ou não confirmadas morte pelo patógeno. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de probabilidade de sobrevivência, utilizando o método de Kaplan-Meier (1958), e à comparação de curvas de sobrevida pelo teste de *Log-rank*, sendo ambos testes não paramétricos. A variável

resposta é o tempo de ocorrência da mortalidade causada pelos diferentes isolados (fungo) em uma determinada dieta. Todas as variáveis de tempo analisadas até a ocorrência do evento (morte das lagartas) foram analisadas sob a abordagem não paramétrica pelo software R v. 4.3.2 (R Core Team, 2023), utilizando os pacotes *lattice*, *latticeExtra* e *survival* (Gray, 2014) para ajustar os modelos aos dados descritos.

3. RESULTADOS

3.1. Sobrevivência das lagartas de *C. includens* alimentadas com diferentes substratos e a virulência dos isolados de *M. rileyi*.

A análise da estimativa de Kaplan-Meier indica que a sobrevivência de *C. includens* foi impactada pelos isolados de *M. rileyi* e a virulência de cada isolado foi influenciada pelo substrato alimentar. Observou-se que o isolado Mr27 causou a maior redução na sobrevivência das lagartas (19%), quando foram alimentadas com folhas de algodão, iniciando o evento no terceiro dia. Por outro lado, o isolado Mr304 também resultou em uma diminuição de 19% na sobrevivência, mas o último evento ocorreu no sétimo dia após a inoculação. É importante notar que, apesar da mesma redução percentual na sobrevivência, os isolados Mr27 e Mr304 apresentaram diferenças na velocidade com que causaram a mortalidade, com o Mr27 sendo mais rápido, ocorrendo as mortes até o quinto ou sexto dia, em menos dias que o isolado Mr304 (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativas de Kaplan-Meier indicando número de tempos totais em cada combinação de tratamento e o tempo onde ocorreu a menor sobrevivência para a espécie *Chrysodeixis includens*.

<i>Chrysodeixis includens</i>				
Substratos	Isolados	Nº de tempo (t)*	< Tempo de sobrevivência	% de sobrevivência
Algodão	Mr141	t=(2-3-4-5)	t(6) = 0,254	25,4
	Mr27	t= (3-4-5-6)	t(6)=0,190	19,0
	Mr304	t =(3-4-5-6-7)	t(7)=0,190	19,0
	Mr557	t =(2-4-5-6-7-8)	t(8)=0,406	40,6
	Mr604	t = (3-4-5-6-7-8)	t(8)=0,422	42,2
Dieta Artificial	Mr141	t=(3-4-6-7)	t(7) = 0,750	75,0
	Mr27	t= (1-2-3-4-5-6)	t(6)=0,281	28,1
	Mr304	t =(3-4-5-6-7)	t(7)=0,769	76,9
	Mr557	t =(2-3-4-5)	t(5)=0,812	81,2
	Mr604	t =(3-4-5-6-7-8)	t(8)=0,672	67,2
Soja	Mr141	t=(3-4-5-6)	t(6) = 0,270	27,0
	Mr27	t= (2-3-4-5)	t(5)=0,119	11,9
	Mr304	t =(3-4-5-6-7-8)	t(8)=0,231	23,1
	Mr557	t =(2-3-4-5-6-7)	t(7)=0,365	36,5
	Mr604	t = (3-4-5-6-7)	t(7)=0,396	39,6

Nº de tempo (t)*= Número de dias que o evento ocorreu.

Na dieta artificial, o isolado que se destacou na diminuição da sobrevivência das lagartas foi o Mr27, resultando em uma queda para 28,1% após seis dias de inoculação do fungo. Da mesma maneira, a taxa de sobrevivência das lagartas após a inoculação dos isolados nas folhas de soja, foi menor (11,9%) quando utilizado o isolado Mr27, alcançando este valor no quinto dia, com a mortalidade iniciando no segundo dia. Esses resultados evidenciam a notável capacidade do isolado Mr27 em reduzir significativamente a sobrevivência de *C. includens* em diferentes dietas.

A sobrevivência das lagartas nas folhas de algodão e soja, foi diferente, embora o isolado Mr27 tenha se destacado em ambas as culturas, na soja proporcionou uma redução mais acentuada (11,9%) em comparação com o algodão (19%). Sendo assim foi necessário aprimorar a compreensão das estimativas de sobrevivência e do comportamento de cada isolado nos três substratos alimentares, portanto foi analisada a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, por meio do teste de Log-rank, das lagartas de *C. includens* expostas aos isolados de *M. rileyi* enquanto se alimentavam de folhas de algodão, soja e dieta artificial (Figura 1).

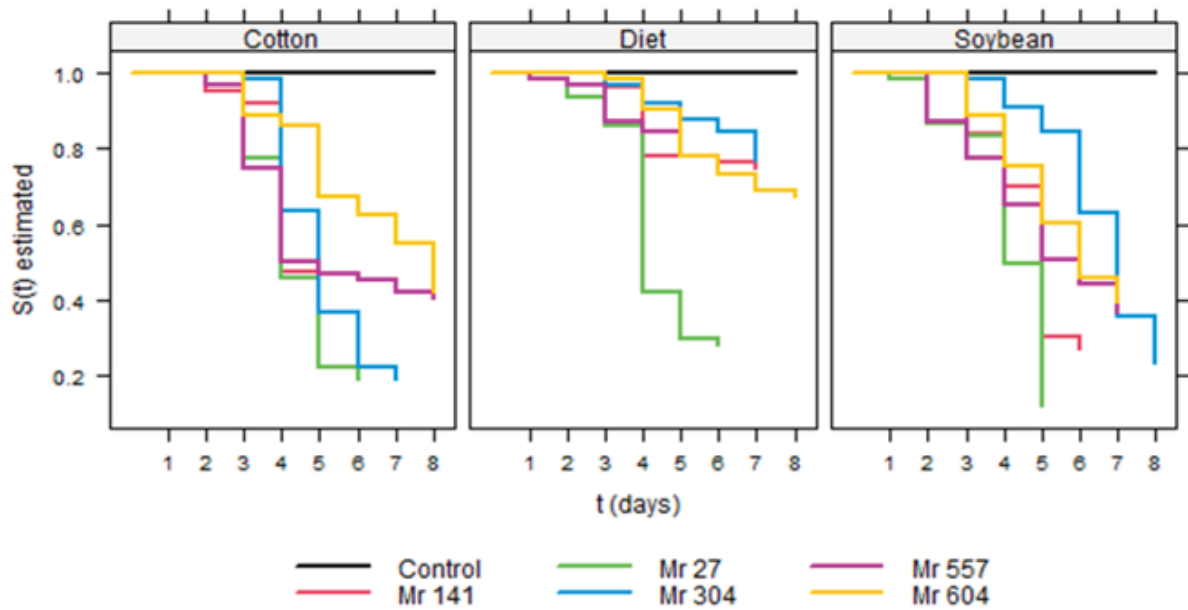


Figura 1. Curva de sobrevivência estimada pelo método de Log-rank para substratos alimentares e isolados de *M. rileyi*, a partir do método de Kaplan-Meier para lagartas do segundo instar de *C. includens*.

A análise da curva de Kaplan-Meier fornece uma compreensão abrangente da interação entre esses fatores. Por meio dessas curvas, é possível visualizar a dinâmica da interação entre o substrato alimentar, o hospedeiro e o patógeno. Nota-se que a sobrevivência das lagartas, quando submetidas apenas à água e Tween (controle), permaneceu em 100% para todos os substratos alimentares, mesmo após o término das avaliações. Mais uma vez, é evidente a virulência do isolado Mr27 em todos os substratos, com o evento de morte ocorrendo mais rapidamente na soja (Figura 1).

3.2. Sobrevivência das lagartas de *H. armigera* alimentadas com diferentes substratos e a virulência dos isolados de *M. rileyi*.

Observa-se uma redução significativa na sobrevivência das lagartas de *H. armigera* quando alimentadas com folhas de algodão e expostas ao isolado Mr27. O declínio na sobrevivência teve início no terceiro dia e, ao término do quinto dia, apenas 17,5% das lagartas permaneciam vivas. É notável que, similarmente ao que foi observado em *C. includens*, o isolado Mr27 se destacou na diminuição da sobrevivência das lagartas de *H. armigera* quando alimentadas com algodão. Contudo, é relevante ressaltar que, enquanto o segundo isolado mais

eficaz na redução da sobrevivência em *C. includens* foi o Mr304, para *H. armigera* foi o Mr557. Este último provocou mortes a partir do segundo dia de avaliação, resultando em uma sobrevivência de apenas 28,1% ao final do sexto dia (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas de Kaplan-Meier indicando número de tempos totais em cada combinação de tratamento e o tempo onde ocorreu a menor sobrevivência para a espécie *Helicoverpa armigera*.

<i>Helicoverpa armigera</i>				
Substratos	Isolados	Nº de tempo (t)*	< Tempo de sobrevivência	% de sobrevivência
Algodão	Mr141	t= (2-3-4-5-6-8)	T(8) = 0,381	38,1
	Mr27	t= (3-4-5)	t(5)=0,175	17,5
	Mr304	t = (3-4-5-7)	t(7)=0,446	44,6
	Mr557	t = (2-3-4-5-6)	t(6)=0,281	28,1
	Mr604	t = (3-4-5-6-7)	t(7)=0,516	51,6
Dieta Artificial	Mr141	t = (3-4-5-6)	t(6) = 0,689	68,9
	Mr27	t= (3-4-6)	t(6)=0,953	95,3
	Mr304	t = (2-5)	t(5)=0,954	95,4
	Mr557	t = (3-4-5-6-7)	t(7)=0,578	57,8
	Mr604	t = (3-4-5-6-7)	t(7)=0,875	87,5
Soja	Mr141	t= (2-3-4-5-6-7-8)	t(8) = 0,145	14,5
	Mr27	t= (3-4-5-6)	t(6)=0,540	54,0
	Mr304	t = (3-4-5-6-7)	t(7)=0,431	43,1
	Mr557	t = (3-4-5)	t(5)=0,125	12,5
	Mr604	t = (3-4-5-6-7)	t(7)=0,206	20,6

Nº de tempo (t)*= Número de dias que o evento ocorreu.

No substrato dieta, observamos que o isolado Mr557 (57,8%) foi o mais virulento na redução da sobrevivência das lagartas de *H. armigera*, iniciando a mortalidade no terceiro dia e finalizando no sétimo dia. Quando as lagartas foram alimentadas com folhas de soja o isolado Mr557 (12,5%) foi o mais eficaz na redução da sobrevivência da praga, iniciando o evento no terceiro dia e após cinco dias reduzindo a sobrevivência para 12,5%, seguido pelo isolado Mr141, que causou a primeira morte no segundo dia e após oito dias reduziu a sobrevivência a 14,5%. As curvas de sobrevivência das lagartas de *H. armigera* expostas a diferentes isolados de *M. rileyi* e alimentadas com diferentes substratos, são apresentadas na Figura 2.

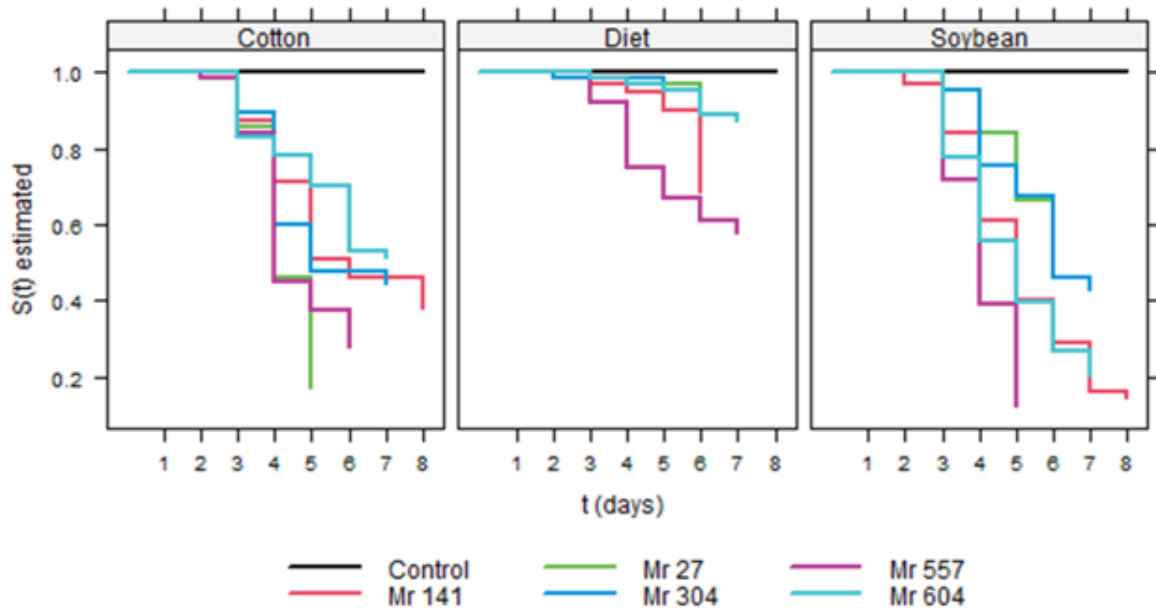


Figura 2. Curva de sobrevivência estimada pelo método de Log-rank para substratos alimentares e isolados de *M. rileyi*, a partir do método de Kaplan-Meier para lagartas do segundo instar de *H. armigera*.

A análise comparativa dos substratos, espécies de lagartas e isolados de *M. rileyi* revela que, de maneira geral, a dieta proporcionou condições mais favoráveis para a sobrevivência de lagartas de ambas as espécies. Notavelmente, o isolado Mr27 destacou-se como o mais eficaz no controle de *C. includens* e *H. armigera* quando as lagartas foram alimentadas com folhas de algodão. Por outro lado, o isolado Mr27 foi o mais eficaz para *C. includens* alimentadas com soja, enquanto para *H. armigera*, se destacou o isolado Mr557. Essas observações sugerem uma influência dos substratos alimentares na virulência dos isolados de *M. rileyi*, indicando que o substrato alimentar em que as lagartas são criadas pode afetar a eficácia dos isolados de *M. rileyi*.

4. DISCUSSÃO

Estudos mostraram evidências de que a planta hospedeira é responsável pela determinação da suscetibilidade de insetos herbívoros a entomopatógenos, e que cada espécie produz um resultado diferente no processo infeccioso (Costa & Gaugler 1989; Gallardo et al. 1990; Hare & Andreadis, 1983; Santiago-Alvarez et al. 2006). Tais evidências se deve aos efeitos tritróficos que são exercidos através dos efeitos da planta no inseto hospedeiro (Jaronski, 2010). De fato, quando os isolados de *M. rileyi* foram aplicados sobre as folhas de soja, algodão e dieta artificial, apesar de ter sido patogênico para ambas espécies de lagartas, houveram diferenças na virulência dos isolados a depender do substrato, isso indica que a atividade do

fungo é influenciada pela planta, e que se deve levar em consideração tanto a suscetibilidade da praga, quanto a planta hospedeira na escolha do isolado promissor para ser usado como bioinseticida. Porém, a maioria dos estudos com seleção de isolados fúngicos para o controle de pragas, concentram-se na suscetibilidade do inseto e não levam em consideração as plantas hospedeiras (Bayissa et al., 2016; Loureiro & Moino, 2006), os resultados deste estudo indicam que em pragas polífagas como a *C. includens* e *H. armigera*, faz-se necessário considerar os níveis de mortalidade dependendo da planta em que o inseto foi criado e não só na virulência do isolado.

Essas interações entre *M. rileyi* e substrato alimentar encontradas no presente trabalho ficam evidentes quando comparamos os resultados encontrados nas lagartas de *C. includens* alimentadas com folhas de soja, o isolado que causou maior mortalidade foi o Mr27 e em lagartas alimentadas com folhas de algodão o isolado Mr27 se igualou ao Mr304, deferindo apenas em tempo de mortalidade. Apesar dessa pequena diferença, o Mr27 apresentou maior plasticidade nas diferentes culturas para o infectar *C. includens* (Figura 1). Já em *H. armigera* alimentadas com soja o isolado que causou maior mortalidade foi o Mr141 e Mr557, porém o isolado Mr557 matou mais rápido, no quinto dia, havia apenas 12% de lagartas vivas, enquanto o Mr141 causou 14% de mortalidade até oitavo dia (Figura 2). Quando consideramos o substrato de folhas de algodão, o isolado Mr27 se destacou como o mais impactante na diminuição da sobrevivência das lagartas de *H. armigera*, indicando uma resposta diferente em comparação com a soja. Portanto, características do algodão e soja podem influenciar de maneira distinta a ação dos isolados fúngicos.

De maneira semelhante, Gallardo et al. (1990), indicaram que a suscetibilidade de *Helicoverpa zea* ao fungo *M. rileyi* pode variar de acordo com a alimentação, no estudo afirmaram que dieta artificial contendo tomatina impede a ação do fungo diminuindo a suscetibilidade das lagartas de *H. zea*. Adicionalmente, Santiago-Alvarez et al. (2006) afirmaram que nutrição tem influência na saúde geral de um inseto, e que pode modular os efeitos dos entomopatógenos fúngicos. Por exemplo, *Bemisia tabaci* criados em pino, tomate, melão, pimentão, batat, berinjela, repolho, feijão ou algodão apresentaram diferentes suscetibilidades a *Beauveria bassiana*, com diferenças significativas nos tempos médios de sobrevivência (Santiago-Alvarez et al. 2006).

Diferenças nutricionais também foram apontadas como um possível fator que contribui para a suscetibilidade a fungos entomopatogênicos, como observado por Hare & Andreadis, 1983, onde destacaram que a planta hospedeira teve um impacto significativo na suscetibilidade das larvas do besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*) ao *B. bassiana*. A pesquisa revelou

que as plantas de batata cultivadas em estufa foram menos propícias para o inseto em comparação com aquelas cultivadas em campo, resultando em uma maior suscetibilidade ao *B. bassiana*. Salienta-se que o local de cultivo das plantas pode influenciar a interação com entomopatogênicos fúngicos, como discutido no estudo.

Em geral, acredita-se que fatores nutricionais, a morfologia e a composição química da planta podem afetar a ação dos fungos, pois as plantas produzem substâncias para deter os herbívoros e, portanto, esses compostos teriam efeito sobre os entomopatógenos. Poprawski & Jones (2000), mostraram que a germinação de *Cordyceps fumosorosea* e *B. bassiana* foi consideravelmente reduzida na cutícula de insetos criados em algodão, e os autores sugeriram que era o resultado a uma resposta fungistática de uma substância química secundária produzida pelo algodão. Além disso sabe-se que alguns grupos de insetos, principalmente lepidópteros, são capazes de sequestrar compostos secundários das plantas para sua própria defesa (Kuhn et al., 2004).

No entanto, há outros sistemas envolvendo insetos e entomopatógenos nos quais a presença da planta não exerceu efeito significativo. Por exemplo, o besouro da batata demonstrou a mesma suscetibilidade ao *Beauveria*, mesmo quando criado em diferentes plantas (Costa & Gaugler, 1989). Essa inconsistência associada à influência da planta apresenta implicações significativas para uma adoção mais abrangente desses fungos no controle de pragas. A eficácia no controle de insetos pode variar consideravelmente entre diferentes culturas, sendo mais eficiente em algumas do que em outras. A ausência de informações mais detalhadas sobre os efeitos específicos de cada planta pode ter impactos significativos, dada a diversidade de plantas comumente utilizadas, resultando em uma lacuna de conhecimento relevante.

Porém, os resultados aqui obtidos destacam que as plantas exercem sim uma influência na atividade dos isolados de *M. rileyi*, e essa interação é sensível às necessidades nutricionais dos insetos. Essa abordagem pode contribuir para estratégias mais eficientes no controle de pragas, considerando a diversidade de plantas cultivadas em diferentes contextos agrícolas. Portanto, com base nos resultados, é plausível afirmar que houve diferenças na eficácia dos isolados fúngicos em relação aos substratos alimentares soja e algodão. Essas diferenças ressaltam a importância de considerar a variabilidade nos resultados e adaptar as estratégias de controle biológico de acordo com as condições específicas de cada cultura e inseto alvo. A compreensão dessas variações é relevante para otimizar a eficácia dos bioinseticidas no Manejo Integrado de Pragas em diferentes contextos agrícolas.

5. CONCLUSÃO

A análise da sobrevivência das lagartas de *C. includens* e *H. armigera* expostas a diferentes isolados de *M. rileyi* revelou uma notável influência do substrato alimentar na virulência desse patógeno. O isolado Mr27 destacou-se como eficaz na redução da sobrevivência, sendo mais rápido em causar mortalidade, especialmente quando as lagartas foram alimentadas com folhas de algodão. A comparação entre substratos de folhas de algodão e soja ressaltou a importância de considerar não apenas a virulência dos isolados, mas também as condições específicas de cada cultura no Manejo Integrado de Pragas (MIP). A descoberta de que a escolha do substrato pode afetar a eficácia dos bioinseticidas destaca a necessidade de uma abordagem mais abrangente, considerando não apenas a suscetibilidade do inseto, mas também as características nutricionais e químicas da planta hospedeira, contribuindo para estratégias mais eficientes no controle de pragas em diferentes contextos agrícolas.

REFERÊNCIAS

- Allen, G. E., Greene, G. L., Whitcomb, W. H. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* in Florida. **Florida Entomologist**, v. 54, p. 189-191, 1971.
- Alves, S. B. 1998. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, p.289-381: Fungos entomopatogênicos.
- Bayissa, W., Ekesi, S., Mohamed, S. A., Kaaya, G. P., Wagacha, J. M., Hanna, R., Maniania, N. K. 2016. Selection of fungal isolates for virulence against three aphid pest species of crucifers and okra. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 1, p. 355–368. doi:10.1007/s10340-016-0781-4.
- Cory, J. S., Ericsson, J. D. 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. **BioControl**, v. 55, p. 75–88.
- Costa, S. D., Gaugler, R. R. 1989. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to solanine and tomatine: plant defensive chemicals inhibit an insect pathogen. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, p. 697–706.
- Costa, V. H. D., Soares, M. A., Rodríguez, F. A. D., Zanuncio, J. C., Silva, I. M., Valicente, F. H. 2015. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 796-798.
- Csikos, G., Molnar, K., Borhegy, N. H., Talian, C. S., Sass, M. 1999. Insect cuticle, an in vivo model of protein trafficking. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2113–2124.
- Faria, M. R., Tigano-Milani, M. S., Lecuona, R. E. 1993. Incidência natural de *Nomuraea rileyi* Farlow em população de *Anticarsia gemmatalis* Hübner no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, p. 385-388.
- Ferrari, J., Godfray, H. C. J. 2003. Resistance to a fungal pathogen and host plant specialization in the pea aphid. **Ecology Letters**, v. 6, p. 111–118.
- Gallardo, F., Boethel, D. J., Fuxa, J. R., Richter, A. 1990. Susceptibility of *Heliothis zea* (Boddie) larvae to *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson effects of α -tomatine at the third trophic level. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 1751–1759
- Gillespie, J. P., Burnet, C., Charnley, A. K. 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal Insect Physiol**, v. 46, p. 429–437.
- Golzan, S. R., Talaei-Hassanloui, R., Homayoonzadeh, M., Safavi, S. A. 2023. Role of cuticle-degrading enzymes of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in virulence on *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 26, p. 038-52.
- Greene, G. L., Leppla, N. C., Dickerson, W. A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488.
- Gray, R. J. Cmprsk: subdistribution analysis of competing risks. R package version 2.2-7.

2014. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=cmprsk>>. Acesso em: 15 Dez. 2023.
- Hare, J. D., Andreadis, T.G. 1983. Variation in susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) when reared on different host plants to the fungal pathogen, *Beauveria bassiana* in the field and laboratory. **Journal of Environmental Entomology**, v. 12, p. 1892-1897.
- Hoffmann, C. B., Oliveira, E. B., Moscardi, F. Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*). Embrapa-CNPSo, Documentos 10, p. 20, 1985.
- Ignoffo, M. C., Boucias, B. D. 1992. Relative activity of geographical isolates of *Nomuraea* bioassayed against the cabbage looper and velvetbean caterpillar. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 215-217.
- Inbar, M., Gerling, G. 2008. Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 431–448.
- Inyang, E. N., Butt, T. M., Ibrahim, S. J., Clark, B. J., Pye, A. Beckett, S. Archer. 1998. The effect of plant growth and topography on the acquisition of conidia of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* by larvae of *Phaedon cochleariae*. **Mycological Research**, v. 102, n.11, p.1365–1374.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Johnson, D. L. 2004. Persistence of entomopathogenic fungi in soil ecosystems. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 2, p.93-98. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.07.010>
- Jackson, M. A., Dunlap, C. A., Jaronski, S. T. 2009. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **The Ecology of Fungal Entomopathogens**, p. 129–145. doi:10.1007/978-90-481-3966-8_10
- Jaronski, T. S. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, p. 159–185.
- Jin, T., Silva, A. L., Prado, P. C. N., Cunha, H. P. 1978. Avaliação da mortalidade natural de *Trichoplusia ni* (Hueb., 1802) e *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) por diversos microorganismos, **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 8, n. 1, p. 31-37.
- Johnson, M. T. J. 2008. Bottom-up effects of plant genotype on aphids, ants and predators. **Ecology**, v. 89, p. 145–154.
- Kaplan, E. L., Meier, P. 1958. Non parametric estimation from incomplete observation. **Journal of the American Statistics Association**, v.53, p. 457-481.
- Kuhn, J., Pettersson, E. M., Feld, B. K., Burse, A., Termonia, A., Pasteels, J. M., Boland, W. 2004. Selective transport systems mediate sequestration of plant glucosides in leaf beetles: a molecular basis for adaptation and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 13808–13813.

- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? **Biological Control**, v.21, p. 230-248.
- Lee, K. P., Cory, J. S., Wilson, K., Raubenheimer, D., Simpson, S. J. 2006. Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 173, p. 823–829.
- Loureiro, E. S., Moino Jr, A. 2006. Pathogenicity of Hyphomycete fungi to phids *Aphis gossypii* Glover and *Myzus Persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 660-665.
- Poprawski, T. J., Jones, W. J. 2000. Host plant effects on activity of the mitosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against two populations of *Bemisia* whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Mycopathologia**, v. 151, p. 11–20.
- Rajula, J., Karthi, S., Mumba, S., Pittarate, S., Thungrabead, M., Krutmuang, P. Current status and future prospects of entomopathogenic fungi: A potential source of biopesticides. 2021. **Recent Advancement in Microbial Biotechnology**, v.4, p. 71-98.
- Santiago-Alvarez, C., Maranhao, E. A., Maranhao, E., Quesada-Moraga, E. 2006. Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. **BioControl**, v. 51, p. 519–532.
- Sosa-Gómez, D. R., Silva, J. J. 2002. **Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados**. Londrina: Embrapa Soja, 32p. (Documentos 188).
- Sosa-Gómez, D. R., López., Lastra, C, C., Humber, R. A. 2010. Uma visão geral dos fungos associados a artrópodes da Argentina e do Brasil. **Mycopathologia**, v. 170, p. 61–76.

CAPÍTULO 4. INFLUÊNCIA NA FIXAÇÃO E GERMINAÇÃO DE *Metarhizium rileyi* NAS SUPERFÍCIES FOLIARES DE ALGODÃO E SOJA: UMA VISÃO DAS INTERAÇÕES FUNGOS-PLANTAS

Tamires Doroteo de Souza^a, Maria Cristina Neves de Oliveira^b, Guilherme Julião Zocolo^c, Admilton Gonçalves de Oliveira^d, Daniel R. Sosa-Gómez^{c*}

^atamiresdoroteo@gmail.com - Department of Zoology, Biological Science Sector, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil. ^b Department of Statistics Embrapa Soybean, – P.O. Box 4006 – CEP 86085-981, Londrina, PR, Brazil. ^c Department of Entomology Embrapa Soybean, – P.O. Box 4006 – CEP 86085-981, Londrina, PR, Brazil. ^d admilton@uel.br - Laboratório de Biotecnologia Microbiana - LABIM. P.O. Box 10.011, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86057- 970, PR, Brazil

RESUMO

Os agentes de controle microbiano, particularmente os fungos entomopatogênicos, desempenham um papel essencial na regulação das populações de artrópodes. Este estudo explora as interações entre esses microrganismos e plantas, abordando as interações entre compostos epicuticulares de folhas de algodão soja e *Metarhizium rileyi*. Dez isolados de *M. rileyi*, obtidos do acervo de culturas da Embrapa Soja, foram utilizados nos experimentos. A fixação e persistência do fungo em folhas de algodão e soja foram estudadas utilizando o padrão de deposição de conídios por meio de microscopia eletrônica de varredura. A avaliação do desenvolvimento do fungo sobre o filopiano das folhas envolveu a extração de compostos epicuticulares das folhas de algodão e soja utilizando solventes de diferentes polaridades (água, clorofórmio, etanol, hexano). Os compostos extraídos foram então utilizados em análises de aderência e germinação e para análises cromatográficas. Os resultados demonstraram variações na fixação dos conídios e nas taxas de germinação influenciadas pelo tipo de solvente utilizado para obter os extratos das folhas das espécies vegetais. Os extratos de folhas de algodão e soja obtidos com clorofórmio e hexano mostraram, em geral, maior aderência de conídios em comparação com os obtidos com água ou etanol. A microtopografia das folhas, examinada por microscopia eletrônica de varredura, revelou uma distribuição mais uniforme de conídios na superfície de folhas de algodão, enquanto nas folhas de soja os conídios tendiam a formar agregados. Na análise da germinação, os extratos das folhas de algodão com etanol afetaram significativamente a germinação dos conídios, com impacto mais severo em alguns isolados. A germinação variou nos extratos de clorofórmio e hexano, sendo mais alta em alguns isolados (Mr27). Após a análise química foi possível identificar substâncias como o β -Amyrin e o D-Mannitol que são compostos presentes com maior intensidade no algodão e quase inexistentes na soja. Outras substâncias são encontradas no algodão como Lanosta-8,24-Dien-3-one, assim como, o D-Pinitol, β -Fructofuranose, Ribitol e ácido Butanóico. Essas diferenças aparentemente influenciaram o comportamento de *M. rileyi* na fixação e germinação.

Palavras-chave: Fungos, Interações fungo-planta, Agentes de biocontrole, Perfil químico de folhas.

INFLUENCES ON THE ATTACHMENT AND GERMINATION OF *Metarhizium rileyi* ON COTTON AND SOYBEAN LEAF SURFACES: AN INSIGHT INTO FUNGAL-PLANT INTERACTIONS

ABSTRACT

Microbial control agents, particularly entomopathogenic fungi, play a crucial role in regulating arthropod populations. This study explores the interactions between these microorganisms and plants, addressing the interactions between epicuticular compounds of soybean and cotton leaves and *Metarhizium rileyi*. Ten isolates of *M. rileyi*, obtained from the Embrapa Soja culture collection, were used in the experiments. The attachment and persistence of *M. rileyi* conidia on cotton and soybean leaves were studied using scanning electron microscopy. Conidial attachment and germination were studied on epicuticular compounds extracted with water, chloroform, ethanol, and hexane from cotton and soybean leaves. The extracted compounds were submitted to chromatographic analyses. Cotton and soybean leaf extracts obtained with chloroform and hexane showed, in general, higher conidial adherence compared to those obtained with water or ethanol. The microtopography of the leaves, examined by scanning electron microscopy, revealed a more uniform distribution of conidia on the surface of cotton leaves, while on soybean leaves the conidia tended to form aggregates. Cotton leaf extracts with ethanol significantly affected the germination of conidia, with a more severe impact on some isolates (Mr10). Germination varied in chloroform and hexane extracts, being higher in some isolates (Mr27). Chemical analysis was able to identify substances such as β -Amyrin and D-Mannitol, which are the substances present most intensely in cotton and almost non-existent in soybeans. Other substances are found in cotton such as Lanosta-8,24-Dien-3-one, as well as D-Pinitol, β -Fructofuranose, Ribitol and Butanoic acid. These differences seem to influence the behavior of *M. rileyi* in attachment and germination.

Keywords: Fungi, Fungal-plant interactions, Spore germination, Biocontrol agents, Chemical profile leaves

1. INTRODUÇÃO

Agentes de controle microbiano, como fungos entomopatogênicos, desempenham papel relevante na regulação de populações de espécies de artrópodes e no manejo de pragas agrícolas. Sob condições ambientais adequadas e na presença de alvos suscetíveis, podem desencadear casos generalizados de micoses, denominadas epizootias. Em ambientes agrícolas, esse fenômeno tem sido observado em diversas espécies de fungos das ordens Entomophthorales e Hypocreales em artrópodes associados a culturas como cevada, algodão, trigo, soja, sorgo, cana-de-açúcar entre outras (Carruthers & Soper, 1987; Feng et al., 1992; Sosa-Gómez, 2010; Goble et al., 2012; Haar et al., 2018; Clifton et al., 2019).

Embora o uso de fungos entomopatogênicos no controle de pragas esteja parcialmente consolidado, há uma lacuna em estudos que abordem as interações entre esses microrganismos e as plantas (Baverstock et al., 2005; Sosa-Gómez, 2012). As inter-relações entre plantas e fungos entomopatogênicos são multifacetadas, manifestando-se através de endofitismo (Quesada-Moraga et al., 2020; Matzoukas & Eliopoulos, 2020), voláteis induzidos pelo hospedeiro da planta (Baverstock et al., 2005; Houndtondji et al. 2005), presença de cera (Duetting et al. 2003), exsudados de raízes (Pava-Ripoll et al., 2011) e exsudados foliares (Cerritos-Gracia et al., 2021).

Inyang et al. (1998) destacaram que, além dos fatores abióticos, a interação com o substrato (folhas, galhos e outras superfícies da planta) também pode afetar a eficácia dos fungos durante o processo infeccioso. A influência pode ser devida a interações químicas com substâncias presentes na superfície foliar, interações com a microbiota do filoplano ou interações físicas (hidrofobicidade, hidrofiliabilidade) dependendo da estratégia de fixação utilizada pelo fungo (Boucias & Pendland, 1991).

Da mesma forma, a microtopografia da superfície foliar, o formato e a composição da cera epicuticular, os tricomas estomáticos desempenham um papel significativo na deposição, distribuição e fixação de entomopatógenos na superfície da planta (Inyang et al., 1998 e 2000). Esses aspectos podem favorecer ou dificultar a adesão dos fungos à planta, impactando diretamente na sua interação com o patógeno. Entretanto, pouco se sabe sobre a interação dos fungos entomopatogênicos e os compostos epicuticulares presentes nas superfícies dos vegetais economicamente importantes. Portanto, este estudo tem como objetivo elucidar as interações entre os extratos epicuticulares das folhas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e soja (*Glycine max* L.) e *Metarhizium rileyi*.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Isolados de *Metarhizium rileyi*

Os isolados de *Metarhizium rileyi* (n=10) foram obtidos da coleção de culturas da Embrapa Soja (Sosa-Gómez e da Silva, 2002) coletadas entre 1990 e 2018 (Tabela 1). A escolha dos isolados se baseou nos anos de coleta, região geográfica e nos resultados da análise de diversidade genética por SSR, priorizando isolados que estivessem em clusters genéticos diferentes.

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium rileyi*.

Isolados	Hospedeiros	Locais de coleta	Anos de coleta
Mr 174	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999
Mr 27	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1990
Mr 455	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	2002
Mr 482	<i>Chrysodeixis includens</i>	Bela Vista do Paraíso, PR, Brasil	2005
Mr 304	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Planaltina, DF, Brasil	1999
Mr 10	Larva de Lepidoptera	Assis, SP	1990
Mr 254	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Warta, PR, Brasil	1999
Mr 593	Larva de Lepidoptera	Quincy, FL, USA	1993
Mr 604	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Vilhena, RO, Brasil	2018
Mr 32	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Ponta Grossa, PR, Brasil	1990

Os isolados ficam armazenados e suspensões de conídios em leite desnatado e preservados em sílica gel a -20 °C (Smith e Onions, 1983). Para evitar subculturas repetidas, os conídios adsorvidos em sílica foram plaqueados em SMAY (ágar Sabouraud-maltose mais extrato de levedura, 40 g de maltose, 10 g de neopeptona, 10 g de extrato de levedura e 15 g de ágar e 1 litro de água), e mantidos em câmaras do tipo BOD a 27 °C e fotoperíodo de 12 horas por 12 dias, para obtenção do inóculo necessário em cada experimento.

2.2. Fixação e persistência do fungo em folhas de algodão e soja

Para verificar o padrão de deposição de conídios na superfície de folhas de soja e algodão, conídios de *M. rileyi* com 12 dias de idade foram nebulizados nas superfícies adaxial e abaxial das folhas em duas plantas de cada cultura na concentração de 1×10^8 conídios /mL de água destilada sem adição de surfactantes. Após 24, 48 e 72 horas, quatro folhas de algodão e quatro

folíolos de soja de cada planta no estágio fenológico vegetativo (V5) (folhas totalmente formadas) foram coletadas para análise em microscopia eletrônica de varredura. Não observada diferença entre os tempos de coleta e por esta razão nossos resultados só mostram a distribuição dos conídios após 24 horas. A idade e a fase fenológica foram padronizadas para evitar influência nos processos de germinação ou fixação conforme Inyang et al., (1999). A aplicação foi realizada em ambiente fechado com as culturas avaliadas. Após a nebulização de suspensão de conídios, a deposição e o padrão de distribuição destes nas folhas de soja e algodão foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Para isso, as amostras foram fixadas pelo método do vapor de tetróxido de ósmio e metalização com ouro (Quattlebaum & Carner, 1980).

2.3. Extratos foliares

Os compostos epicuticulares foram extraídos utilizando solventes de diferentes polaridades, sendo eles, água destilada, clorofórmio (Synth P.A.-A.C.S. [1480G] 100%), etanol (Synth P.A.-A.C.S. [790g] 99,5%) e hexano (Synth P.A.-A.C.S [660g]). Cabe ressaltar que a composição das ceras na superfície foliar depende da fase fenológica (Barthlott et al., 1998; Koch & Barthlott, 2006) e, por esse motivo, os extratos foram obtidos de folhas de algodão (variedade BRF 370 RF) e soja (variedade BRS 284) no estágio vegetativo (V5). As extrações foram obtidas de folíolos/folhas individuais em 5 ml de cada solvente, evitando o contato com os pecíolos das folhas para evitar a extração de compostos da seiva, após a extração cada amostra foi evaporada em N₂ para minimizar a oxidação. Os resíduos foram pesados e suspensos nos respectivos solventes em volume proporcional ao peso, para que todos os extratos ficassem na mesma concentração (1:1). Os compostos epicuticulares foram armazenados a -20°C e posteriormente utilizados em análises de aderência (fixação), germinação e cromatográficas.

2.4. Ensaios de fixação e germinação de conídios em extratos epicuticulares

O teste de fixação de conídios foi realizado conforme descrito por Sosa-Gómez et al., (1997). Gotículas de 75 µL de cada extrato foram aplicadas em lâminas de vidro e nebulizadas com suspensão de conídios de *M. rileyi*, verificando com aumento de 200 x no microscópio ótico (Olympus BX51M) se a densidade dos conídios na lâmina era adequada para realizar as contagens. Depois de secas, as lâminas foram lavadas com 2 mL de água para remover o excesso de conídios e os conídios restantes foram contados para estabelecer a densidade de

conídios por campo do microscópio (400x). O número de conídios remanescentes foi submetido à análise estatística para verificar a diferença entre os tratamentos.

A influência dos compostos epicuticulares na germinação fúngica foi determinada pela aplicação de cada extrato (150 µL) na superfície de uma fina camada de meio SMAY ou agarose ultrapura (Invitrogen™) distribuída em lâmina de vidro, os quais foram incubados em câmara úmida, a 26°C. As porcentagens de conídios foram determinadas avaliando-se a viabilidade após 16 e 48 horas de incubação, seguindo metodologia de Faria et al. (2015). Após 48 h, não foi possível avaliar porque a maioria dos conídios não estava visível devido ao extenso crescimento de hifas.

A germinação dos conídios foi avaliada por observação microscópica direta, os conídios germinados foram identificados com tubos germinativos maiores que a largura de um conídio não germinado. Os ensaios foram repetidos quatro vezes no mesmo dia e quatro vezes ao longo do tempo. Não houve germinação em nenhum teste realizado com meio agarose ultrapura, portanto, esses dados não foram utilizados para análise estatística. Eliminando quaisquer vieses que o solvente pudesse estar influenciando a germinação, foram realizados testes com os solventes e após a confirmação de que os solventes não agiram, os testes continuaram apenas com os extratos obtidos pela lavagem das folhas com os solventes.

Para determinar quais compostos químicos extraídos das folhas do algodão e da soja influenciam na fixação e germinação do fungo, as frações foram analisadas em cromatógrafo gasoso GC-MS 7890B/MSD-5977 A (Agilent, Califórnia, EUA) acoplado a um analisador de espectrometria de massa (EI 70V). Os compostos presentes foram identificados qualitativamente a partir de bibliotecas de software (Van Den Dool & Kratz, 1963).

2.5. Extração e derivatização

No procedimento adaptado de Guedes et al. (2018), extratos secos de hexano, clorofórmio, etanol e água, cada um pesando 10 mg, foram primeiramente alocados em frascos individuais. Esses extratos foram então solubilizados em 200 µL de piridina. Em seguida, um volume igual (200 µL) de MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) foi introduzido na mistura. A solução resultante foi então incubada em banho-maria, mantida a uma temperatura de 37°C por um período de 30 minutos. Após a incubação, as amostras passaram por um processo de filtração utilizando filtro de PTFE de 0,20 µm. As amostras filtradas foram posteriormente armazenadas em frascos de 2 mL e mantidas a uma temperatura de 4 ° C por

um período de 24 horas, em preparação para a análise subsequente de GC-MS (Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa).

2.6. Análise Cromatográfica GC-MS

A partição cromatográfica foi realizada em coluna de fenil-metil 5% (HP-5MS 30mx 0,25mmx 1,0 µm; Agilent Technologies). O gás de extração foi o hélio (1 mL.min⁻¹) e o volume de injeção foi de 1 µL no modo split (1:10) a 260 °C. A temperatura do forno foi mantida a 120 °C por 3 min e depois programada para 320 °C a 3 °C min⁻¹.

O cromatografia gasosa-espectrômetro de massa foi instalado no modo EI (70 V) com uma faixa de massa de varredura de 40 a 660 m/z. O tempo total da análise foi de 79,67 min. Os cálculos de trimetilsilano (TMS) foram identificados experimentalmente por comparação de seus espectros de massa com disponíveis no National Institute of Standards and Technology (NIST) do banco de dados do Spectrometric Reference Database (NIST 2.0) e comparando seus índices de retenção linear (LRI) com a série de alcanos C8 - C30 (Van Den Dool & Kratz, 1963).

2.7. Análise Estatística

As variáveis de fixação e germinação às 16 e 48 horas foram analisadas em delineamento experimental inteiramente casualizado variando no número de tratamentos e repetições para cada um dos bioensaios realizados conforme descrito nos itens acima. Eles foram submetidos à verificação dos pressupostos de normalidade e independência dos resíduos (Shapiro; Welk, 1965; Parente, 1984), da homogeneidade de variância dos tratamentos (Burr; Foster, 1972) e da não aditividade do modelo (Tukey, 1949). Após as análises exploratórias e atendendo aos pressupostos, foram realizadas Análise de Variância (ANOVA) e comparação múltipla de médias por meio do teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Steel, Torrie, 1960) por meio do software estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS) (Instituto, 2009).

3. RESULTADOS

3.1. Fixação de conídios de *Metarhizium rileyi* em extratos epicuticulares de folhas de algodão e soja

O perfil químico dos compostos extraídos da cera epicuticular de folhas de algodão e soja afetou a fixação de conídios de isolados de *M. rileyi*. Quando comparado à fixação em extratos de cultura de algodão, menor fixação foi observada em compostos solúveis em água, no entanto, diferenças foram observadas entre os isolados. Isolados armazenados por mais tempo em sílica gel apresentaram menor fixação, como o isolado Mr10 (Tabela 2).

Os extratos de folhas de algodão e soja obtidos com clorofórmio e hexano geralmente apresentaram maior fixação de conídios em comparação aos compostos extraídos com água ou etanol (Tabela 2). Os resultados obtidos para o fator 'Isolado (I)' indicam variação significativa na fixação de conídios entre os diferentes isolados testados, com valores de F de 32,15 para algodão e 11,39 para soja. Esse achado destaca a importância de considerar a especificidade do isolado na sua interação com as cutículas das plantas.

Tabela 2. Análise de variância e desdobramento da interação de número de conídios de *M. rileyi* fixados sobre extratos cuticulares de algodão e soja obtidos com solventes de diferentes polaridades.

		F valor			
		Algodão	Soja		
Isolados (I)		32.15*	11,39*		
Solventes (S)		33.61*	33,53*		
I * S		10.18*	3,43*		
CV %		34,38	41,42		
Número de conídios/campo do microscópio					
Isolados	Algodão				
	Clorofórmio	Hexano	Etanol	Água	
Mr 174	32,2 abBC	43,5 aABC	43,3 aA	10,7 bA	
Mr 27	52,7 aB	35,2 bBCD	18,2 bcBC	11,0 cA	
Mr 455	50,0 aB	49,0 aAB	18,5 bcBC	29,5 abA	
Mr 482	39,7 aB	29,5 abBCD	20,5 abBC	10,2 bA	
Mr 304	11,2 aCD	14,7 aD	13,2 aC	15,0 aA	
Mr 10	8,0 aCD	17,5 aCD	11,7 aC	4,0 aA	
Mr 254	25,6 aBCD	15,6 aCD	24,5 aBC	22,2 aA	
Mr 593	41,0 aB	38,2 aBCD	28,0 abBC	11,0 bA	
Mr 604	30,5 abBCD	34,5 aBCD	21,2 abBC	15,2 aA	
Mr 32	91,7 aA	68,0 bA	42,5 cA	27,0 cA	
Isolados	Soja				
	Clorofórmio	Hexano	Etanol	Água	
Mr 174	26,5 abCD	29,7 abABC	43,0 aAB	8,5 bA	
Mr 27	33,5 abCD	55,0 aAB	25,2 bABC	15,2 bA	
Mr 455	22,7 aD	8,7 aC	22,0 aBC	22,7 aA	
Mr 482	52,7 aBC	43,5 aAB	40,5 aAB	18,2 bA	
Mr 304	52,7 aBC	15,0 bC	19,7 bBC	13,0 bA	
Mr 10	18,3 aD	12,5 aC	12,7 aC	5,7 aA	
Mr 254	77,6 aAB	29,5 cBC	51,5 bA	22,5 cA	
Mr 593	51,0 aBC	46,0 aAB	39,7 aABC	6,7 bA	
Mr 604	44,0 aCD	49,2 aAB	38,5 aABC	16,5 bA	
Mr 32	86,5 aA	56,7 bA	30,5 cABC	28,5 cA	

*significativo a 1%, CV- Coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Adicionalmente, o fator 'Solvente (S)' demonstrou impacto significativo, com valores de F de 33,61 para o algodão e 33,53 para a soja, mostrando que a escolha do solvente é um fator determinante na fixação dos conídios. A interação Isolado * Solvente (I * S) também se mostrou significativa, com valores de F de 10,18 para algodão e 3,43 para soja, o que sugere uma interdependência complexa entre o tipo de isolado e o solvente utilizado.

O Coeficiente de Variação (CV%) apresentou valores de 34,38% para o algodão e 41,42% para a soja, indicando variação considerável, tanto intra quanto intergrupos. Essa

variabilidade destaca a complexidade dos fatores biológicos que influenciam a interação entre fungos e plantas. Na análise quantitativa de conídios por campo microscópico observa-se uma variação considerável nos números de conídios fixados, dependendo do isolado e do solvente utilizado. Esta parte do estudo fornece uma visão detalhada de como diferentes combinações de isolados e solventes influenciam a adesão de conídios, um aspecto vital para a compreensão da dinâmica da infecção fúngica nas pragas nas culturas de algodão e soja.

Apesar da variabilidade observada, existe uma tendência geral de aumento da fixação de conídios em compostos dissolvidos em solventes apolares. Este padrão também é evidente em extratos derivados de folhas de soja; a maioria dos isolados demonstrou maior quantidade de conídios aderidos aos extratos obtidos com clorofórmio e hexano. Em contrapartida, aqueles extraídos com etanol e água exibiram menos conídios aderidos, conforme detalhado na Tabela 2.

Dados esses resultados variados, a pesquisa foi ainda mais enriquecida com o exame da microtopografia foliar de ambas as espécies de plantas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Nas folhas do algodoeiro, a distribuição dos conídios pareceu mais uniforme em toda a superfície, conforme ilustrado na Figura 1.

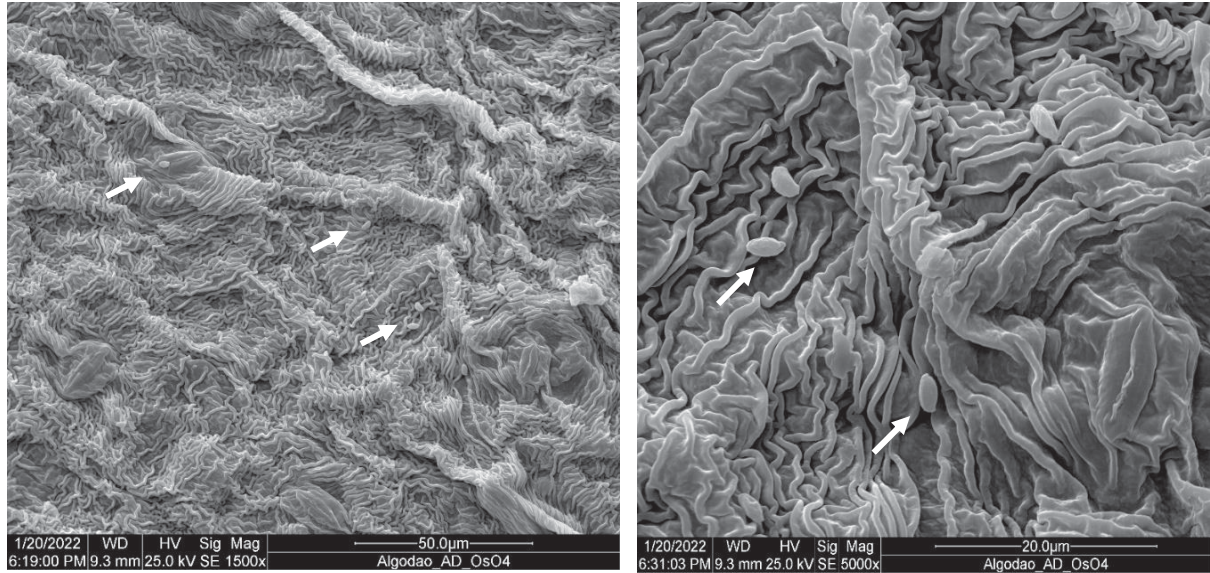


Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da epicutícula de folhas de algodão e como ocorre a distribuição dos conídios de *M. rileyi* na sua superfície.

Por outro lado, nos folíolos da soja, que são mais hidrofóbicos, os conídios tenderam a agregar-se em áreas onde as gotas de água evaporaram. O tamanho desses agregados correlacionou-se com o tamanho das gotículas, fenômeno evidenciado na Figura 2. Neste

estudo, o fungo foi nebulizado sobre as plantas, resultando em gotículas com menos de 10 µm de diâmetro, tamanho este determinado por análise Microscópica.

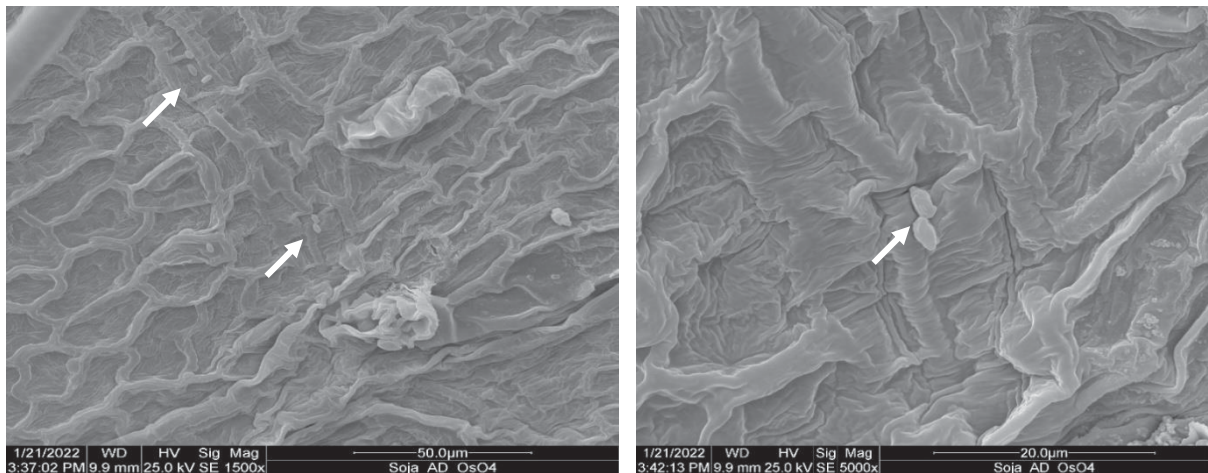


Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da epicutícula de folhas de soja e como ocorre a distribuição dos conídios de *M. rileyi* na sua superfície.

3.2. Germinação de *Metarhizium rileyi* em compostos extraídos de folhas de algodão e folíolos de soja.

A Tabela 3 apresenta uma análise de variância e o desdobramento da interação para a porcentagem de germinação em 16 horas de diferentes isolados de *Metarhizium rileyi* nas culturas, algodão e soja, utilizando diversos solventes. Observa-se que, tanto para algodão, quanto para soja, os valores F para isolado (I), solvente (S) e a interação isolado-solvente (I*S) foram significativos a 1% de probabilidade. O coeficiente de variação (CV %) foi de 16,76 para algodão e 15,47 para soja.

Na cultura do algodão, o isolado Mr 455 mostrou a maior germinação (88,1%) em água, enquanto o isolado Mr 10 teve 0,0% de germinação no extrato obtido com clorofórmio, hexano e etanol. Para a soja, o isolado Mr 455 também exibiu a maior germinação em água (97,0%), e o isolado Mr 304 mostrou 0,0% de germinação em clorofórmio e etanol (Tabela 3)

Tabela 3. Análise de variância e desdobramento da interação da porcentagem de germinação em 16 horas dos isolados de *Metarhizium rileyi* para as culturas algodão e soja sobre os resíduos solúveis nos diferentes solventes.

	F valor	
	Algodão	Soja
Isolados (I)	253,51*	396.49*
Solventes (S)	265.87*	378.64*
I * S	33.25*	36.85*
CV %	16.76	15.47

Isolados	Número de conídios/campo do microscópio			
	Algodão			
	Clorofórmio	Hexano	Etanol	Água
Mr 174	45,7 bA	42,0 bA	22,5 cB	57,2 aB
Mr 27	43,5 aA	21,5 bB	41,7 aA	45,0 aC
Mr 455	27,3 cB	48,0 bA	15,7 dBC	88,1 aA
Mr 482	19,2 aBC	6,5 bcC	0,0 cD	11,2 abE
Mr 304	55,0 aA	45,2 bA	4,33 cCD	52,3 abBC
Mr 10	0,0 aD	5,2 aC	0,0 aD	5,5 aE
Mr 254	54,2 aA	40,0 bA	0,0 cD	59,2 aB
Mr 593	20,2 aBC	21,0 aB	17,0 aB	24,0 aD
Mr 604	13,2 aC	8,0 abC	0,0 bD	10,7 aE
Mr 32	13,7 aC	7,0 abC	5,0 bCD	11,7 abE

Isolados	Soja			
	Clorofórmio	Hexano	Etanol	Água
Mr 174	42,2 bB	58,5 aB	23,7 cB	56,2 aBC
Mr 27	43,5 cB	46,5 cC	61,6 bA	84,7 aA
Mr 455	60,2 cA	84,3 bA	19,6 dBC	97,0 aA
Mr 482	13,0 aC	9,2 aF	0,0 bD	13,0 aEF
Mr 304	0,0 bD	52,6 aBC	0,0 bD	46,6 aC
Mr 10	0,7 bD	6,7 abF	1,0 bD	11,2 aF
Mr 254	42,0 bB	47,7 bC	0,0 cD	62,5 aB
Mr 593	15,0 abC	20,2 aDE	10,0 bCD	22,0 aDE
Mr 604	1,2 abD	9,7 aEF	0,0 bD	9,7 aF
Mr 32	21,5 aC	23,2 aD	6,2 bD	24,7 aD

*significativo a 1%, CV- Coeficiente de variação. Médias seguidas das mesmas letras minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os extratos obtidos de folhas de algodão com etanol afetaram significativamente a germinação dos conídios, com impacto mais severo observado nos isolados Mr 482, Mr 10, Mr 254 e Mr 604 (Tabela 3). Nos compostos extraídos por clorofórmio e hexano, o comportamento germinativo dos isolados variou. Nos extratos de algodão, os isolados Mr 304 (55,0; 49,3), Mr 254 (54,2; 40,0), Mr 174 (45,7; 42,0) e Mr 24 (47,6; 41,7) apresentaram a maior porcentagem de germinação para clorofórmio e hexano, respectivamente. Por outro lado, os isolados Mr 10 (0,0; 5,2), Mr 32 (13,7; 7,0) e Mr 604 (13,5; 8,0) apresentaram os menores percentuais de germinação nestes mesmos extratos. Analisando a porcentagem de germinação nos extratos

aquosos, todos os isolados tiveram melhor desempenho em comparação aos demais extratos no algodão, sugerindo que a água não remove substâncias que inibem a germinação de *M. rileyi* (Tabela 3). Nos testes de agarose ultrapura não foi observada germinação (0%) do fungo com água como solvente e em nenhum dos extratos obtidos utilizando os demais solventes, levando à conclusão de que nenhum solvente remove substâncias que promovem a germinação dos conídios de *M. rileyi*.

Os extratos derivados de folíolos de soja exibiram comportamento semelhante em afetar a germinação do fungo observado em folhas de algodão. Os extratos obtidos com etanol impactaram negativamente a germinação de todos os isolados. As substâncias hidrossolúveis proporcionaram as maiores taxas de germinação, notadamente o isolado Mr 455, que apresentou maior vigor, atingindo uma taxa de germinação de 97% em 24 horas após a inoculação com extratos derivados de extração de água, 84% de germinação com extratos hexânicos e 19,6% com extratos de etanol. Esses resultados apoiam a presença de substâncias nos extratos etanólicos que interferem na germinação do fungo.

Nos extratos de clorofórmio, a porcentagem de germinação dos dez isolados foi novamente semelhante à do hexano, exceto para dois isolados (Mr 10 e Mr 304), que não apresentaram germinação (Tabela 3). Apesar de pertencerem à mesma espécie fúngica, os isolados apresentam comportamentos distintos, alguns com menor vigor ou sendo mais sensíveis ou exigentes em termos nutricionais que outros.

Nas análises da germinação dos isolados fúngicos em até 48 horas após a inoculação dos extratos, houve diferença estatística entre os tratamentos para os fatores isolados e extratos, bem como interação entre os fatores a 1% de probabilidade (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância e desdobramento da interação da porcentagem de germinação após 48 horas dos isolados de *Metarhizium rileyi* sobre os resíduos extraídos com solventes de folhas de algodão e soja.

	F Valor			
	Algodão		Soja	
Isolados (I)	165,51*		330,96*	
Solvente (S)	360,95*		875,06*	
I * S	21,05*		81,77*	
CV %	8,78		6,61	
Número de conídios/campo do microscópio				
Isolados	Algodão			
	Clorofórmio	Hexano	Etanol	Água
Mr 174	88,2 abA	78,5 bB	51,2 cC	93,2 aAB
Mr 27	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
Mr 455	88,2 bA	78,5 bB	29,5 cDE	100,0 aA
Mr 482	94,5 aA	92,0 aA	29,7 bDE	97,5 aA
Mr 304	88,3 aA	68,7 bBC	28,0 cE	83,7 aBC
Mr 10	9,0 bC	17,0 bD	9,7 bF	61,3 aD
Mr 254	99,7 aA	100,0 aA	41,7 bCD	100,0 aA
Mr 593	97,5 aA	93,7 abA	82,5 bB	94,3 aAB
Mr 604	86,7 aA	73,2 bBC	29,2 cDE	83,7 abBC
Mr 32	42,2 cB	60,7 bC	45,0 cC	79,7 aC
Isolados	Soja			
	Clorofórmio	Hexano	Etanol	Água
Mr 174	84,2 bBC	100,0 aA	58,0 cB	100,0 aA
Mr 27	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
Mr 455	66,0 bD	100,0 aA	26,7 cCD	100,0 aA
Mr 482	97,2 aAB	96,2 aAB	2,2 bF	95,5 aA
Mr 304	0,0 dF	66,2 bC	17,6 cDE	100,0 aA
Mr 10	18,5 cE	43,3 bD	9,7 cEF	61,3 aC
Mr 254	98,7 aA	99,5 aA	50,5 bB	100,0 aA
Mr 593	88,3 bC	94,5 abAB	98,2 aA	100,0 aAB
Mr 604	5,0 cF	88,3 aB	28,0 bCD	76,5 aB
Mr 32	66,7 aD	54,7 bCD	34,0 cC	75,0 aBC

*significativo a 1%, CV- Coeficiente de variação. Médias seguidas das mesmas letras minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O efeito dos extratos de ambas as culturas na germinação do fungo após 48 horas apresentou a mesma tendência encontrada após 16 horas de exposição. É interessante notar que em 48 horas após a deposição dos conídios nos extratos extraídos por cada solvente, a germinação dos isolados indicou que as presentes substâncias causam um atraso na germinação. Isso pode ser observado quando se comparam os resultados de germinação na presença de extratos obtidos por água e etanol. Em 16 horas, o isolado Mr27 apresentou baixo percentual de germinação nos extratos etanólicos (21,5% em etanol e 45% em água), e às 48 horas o percentual foi para 100% de germinação nos extratos de algodão. Entretanto, esse comportamento foi observado apenas no isolado Mr27, para os outros nove isolados, a porcentagem de germinação nos extratos etanólicos foi a mais baixa em comparação aos

extratos de outros solventes. Essa peculiaridade pode ser atribuída às características do próprio isolado, destacando a importância de selecionar isolados com melhor desempenho em cada planta hospedeira.

O isolado Mr 10 apresentou a menor porcentagem de germinação em todos os solventes, enquanto o isolado Mr 27 apresentou a maior germinação em todos os extratos. Portanto, pode-se inferir que o vigor dos isolados varia de um isolado para outro, independente do extrato foliar. No entanto, observou-se que os extratos etanólicos da soja atrasam mais a germinação do que os extratos etanólicos do algodão, pois em média, a germinação dos compostos extraídos da soja foi inferior à observada nos extratos de algodão. De maneira geral, os resultados indicaram variações no comportamento dos isolados, os quais foram afetados de maneira benéfica ou prejudicial pelos extratos, variando conforme a cultura analisada. Para entender quais componentes químicos específicos contribuíram para essas variações comportamentais, realizou-se a identificação dos perfis químicos das substâncias presentes nos extratos que foram obtidos utilizando etanol e hexano. Os detalhes dessas substâncias foram apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Compostos químicos identificados em extrato hexânico e etanólicos das folhas de algodão e soja, com respectivo tempo de retenção (t_R em min), índices de retenção teórico e experimental (IR), área relativa de íons representativos (m/z), e a porcentagem (%) de correspondência em comparação a dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) do banco de dados do espectrômetro (NIST 2.0).

Pico	Compostos	t_R (min)	Riexp	Rilit	R. Match	Íons representativos (m/z)	Algodão Etanol	Algodão Hexano	Soja Etanol	Soja Hexano
1	Butanoic acid*	5.05	1270	1260	92.2	73, 75, 117, 147 (BP), 148, 189	-	+	+	-
2	Glycerol*	5.33	1285	1282	96.9	73 (BP), 117, 103, 133, 147, 205	++	+	+	-
3	Ribitol*	19.29	1761	1766	91.6	73 (BP), 103, 147, 205, 217, 307	-	-	+	-
4	β -Fructofuranose*	22.38	1855	1856	90.9	73 (BP), 147, 204, 217, 218, 437	-	-	++	-
5	D-Pinitol*	22.92	1871	1815	83.6	73 (BP), 133, 147, 149, 217, 260	-	-	+	-
6	D (-) -Fructose*	24.87	1933	1930	87.0	132 (BP), 208, 229, 230, 245, 320	++	+	+	-
7	D-Mannitol*	26.17	1974	1979	92.5	73 (BP), 103, 147, 205, 217, 319	++	-	+	-
8	Inositol*	26.87	1995	2000	68.3	43, 73 (BP), 74, 88, 101, 217	+	-	++	+
9	Glucose*	27.95	2032	2031	97.2	73, 147, 191, 204 (BP), 205, 217	+	-	+	+
10	Hexadecanoic acid*	28.56	2052	2050	97.5	73, 75, 117 (BP), 129, 132, 313	++	-	+	++
11	Octadecanoic acid*	34.31	2250	2248	92.9	41 (BP), 57, 69, 118, 131, 133	++	+	+	++
12	β -Amyrin*	59.64	3346	3348	86.6	69, 73, 75, 203, 218 (BP), 219	++	+	+	++
13	α -Amyrin*	60.31	3381	3382	91.5	73, 75, 189, 190, 218 (BP), 219	++	+	+	++
14	Lanosta-8,24-Dien-3-one*	61.16	>3000	3327	82.7	55, 69, 73 (BP), 75, 95, 207	+	++	-	+

*Compostos como derivados de TMS; t_R = tempo de retenção; $R_{I_{exp}}$ = índice de retenção experimental; $R_{I_{lit}}$ = índice de retenção da literatura; BP = Base peak; ++ = alta intensidade, + = baixa intensidade; - = não detectado.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos via GC-MS com respectivos compostos químicos e tempos de retenção (tR), índice de retenção (RI), pico m/z principal e correspondência percentual (%) e na Figura 3 encontra-se a representação das estruturas químicas dos compostos identificados.

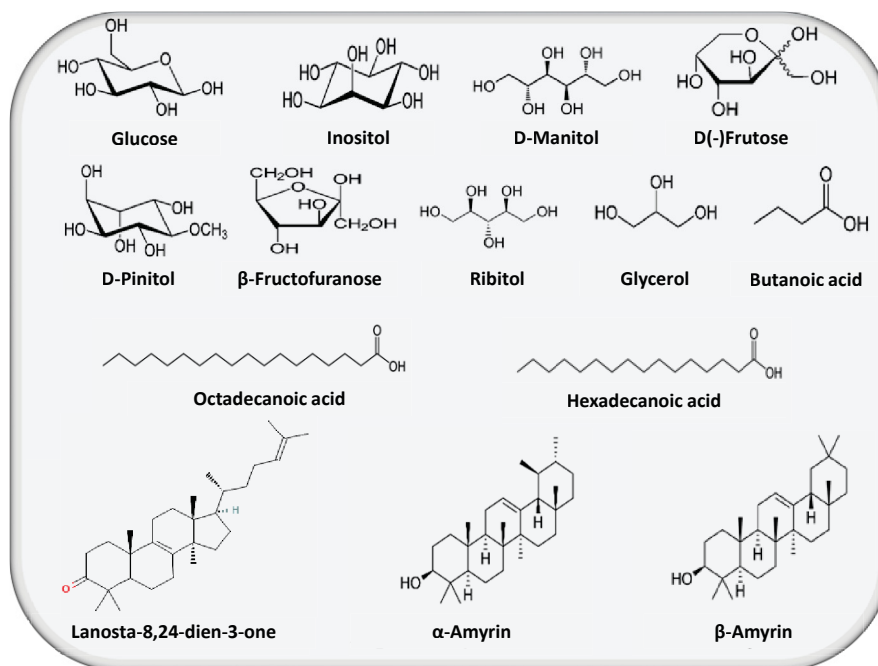


Figura 3. Representação das estruturas químicas dos compostos químicos identificados em extrato extraídos pelos solventes etanol e hexano das folhas de algodão e soja

Nota-se que a intensidade das substâncias no extrato etanólico é maior para as folhas provenientes do algodão do que na soja, como o β -Amyrin e o D-Mannitol que são as substâncias presentes com maior intensidade no algodão e quase inexistente na soja. Outras substâncias são encontradas no algodão como Lanosta-8,24-Dien-3-one. Assim como, o D-Pinitol, β -Fructofuranose, Ribitol e ácido Butanóico que são encontradas somente na soja. A Figura 4 ilustra claramente os mesmos pontos abordados na tabela anterior, as intensidades, presença e ausências das substâncias identificadas nos extratos obtidos pelos tratamentos com hexano nas folhas do algodão e soja.

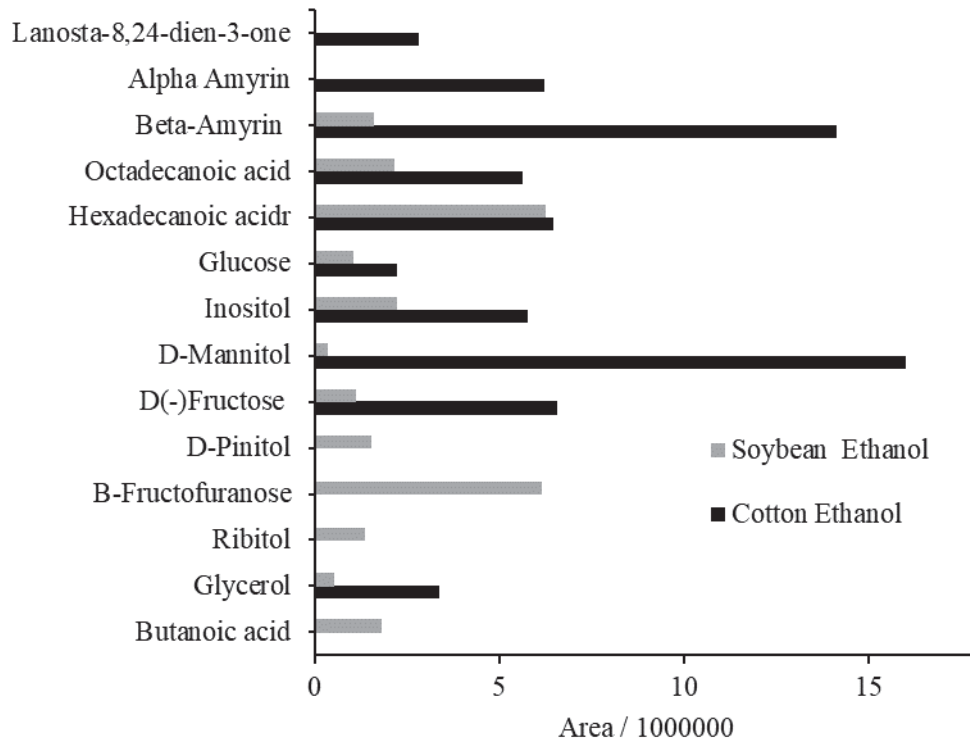


Figura 4. Compostos químicos identificados em extrato etanólicos das folhas de soja e algodão, com suas respectivas massas.

A Figura 5 ilustra claramente os mesmos pontos abordados na figura anterior, as intensidades, presença e ausências das substâncias identificadas nos extratos obtidos pelos tratamentos com hexano nas folhas do algodão e soja. Do mesmo modo que no extrato etanólico, no extrato hexânico é possível nota a diferença na quantidade das substâncias em cada cultura. Na cultura da soja a maior intensidade das substâncias como Octadecanoic acid, β -Amyrin e α -Amyrin. Vale ressaltar que o solvente etanol remove mais substâncias que o hexano como observado nas Figuras 4 e 5. Essa diferença de presença e ausência dessas substâncias podem ser a resposta pela influência no comportamento do fungo em relação a fixação e germinação dos isolados.

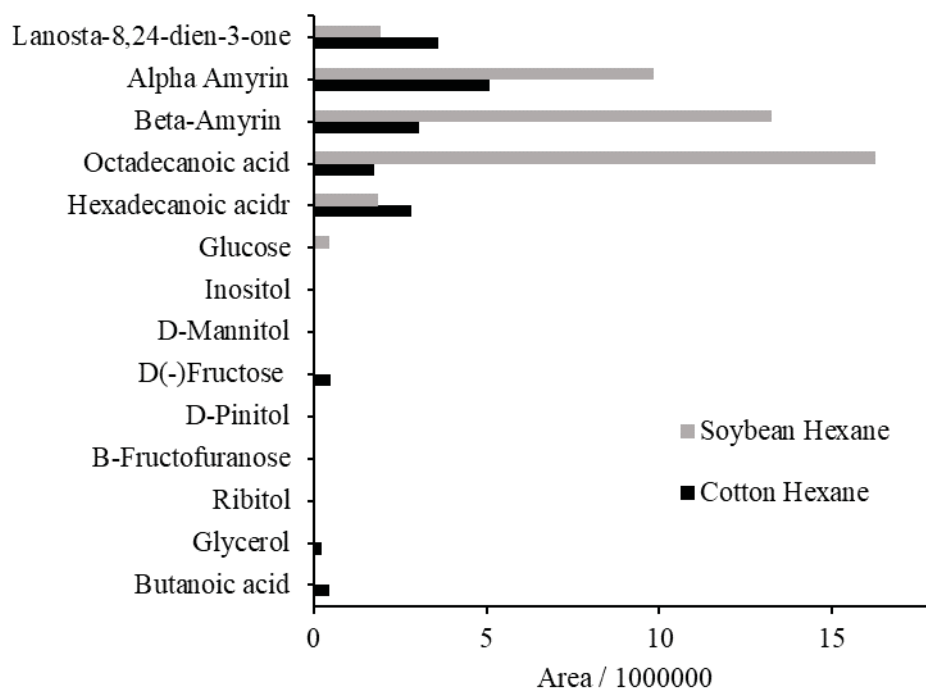


Figura 5. Compostos químicos identificados em extrato hexânico das folhas de algodão e soja, com suas respectivas massas.

4. DISCUSSÃO

O experimento realizado *in vitro* confirmou que a fixação dos conídios de *M. rileyi* sobre as folhas de algodão e soja sofre influência da composição química presente na cera epicuticular e da microtopografia da folha. Esses resultados corroboram com as observações de Inyang et al., 1998, que afirmaram que os compostos cuticulares bem como a morfologia das plantas têm o potencial de afetar a persistência dos conídios no filoplano. Além disso, a fixação dos conídios pode ser influenciada tanto pela remoção física da superfície da folha, como ocorre durante a chuva, quanto pela toxicidade dos próprios componentes foliares, que podem ser letais para os conídios (Inyang et al., 1998).

Embora não tenha sido possível identificar de maneira definitiva qual solvente apresenta extratos que aumentam ou diminuem a fixação dos conídios, é possível discernir uma tendência nas médias de conídios fixados. Por exemplo, os compostos extraídos com etanol e água podem exercer um efeito negativo na fixação do *M. rileyi*, possivelmente devido às propriedades químicas desses compostos que não solubilizam substâncias apolares. Em contraste, os extraídos dos solventes clorofórmio e hexano parecem promover uma maior fixação, o que pode indicar que esses compostos estão facilitando a adesão do fungo. Considerando que os conídios do fungo são constituídos por um alto teor de aminopeptidases e hidrofobina, e que durante o

processo de fixação dos conídios, as hidrofobinas interagem com a superfície, elas formam um filme anfipático, apresentando regiões hidrofóbicas e assim repelindo as superfícies polares justificando a baixa fixação nos extratos extraídos pela água e etanol (Wösten & De Vocht, 2000; Wösten, 2001).

A espécie de planta hospedeira e a idade da folha também podem ser outros fatores com influência significativa na fixação dos conídios, não só sobre as folhas, como também a aquisição dos conídios pelos insetos alvo dos fungos entomopatogênicos. Pesquisas realizadas com o repolho chinês (*Brassica rapa* L.) e o fungo *Metarhizium anisopliae* revelaram que a mortalidade de insetos por infecção fúngica diminuiu drasticamente devido à reduzida fixação dos conídios nas folhas (Inyang et al., 2000). Da mesma forma, Ugine et al. (2007) relataram que a DL_{50} de *Beauveria bassiana* em tripes (*Frankliniella occidentalis* L.) foi quase sete vezes maior em feijão do que em flores ocidentais. Este efeito diferencial foi acompanhado por uma aquisição diferente dos conídios que se encontravam na superfície das folhas.

Os achados desse trabalho confirmaram que o comportamento dos conídios com a fixação sobre as folhas de algodão e soja são diferentes, com o número de conídios fixados maior na soja do que no algodão. Além disso, diferenças visuais também foram observadas pelas análises de microscopia eletrônica de varredura que avaliou a distribuição dos conídios sobre as folhas, revelando que os conídios de *M. rileyi* tendem a formar agregados na soja enquanto no algodão ficam mais dispersos, tal fato pode justificar o porquê de a fixação na soja ser maior do que no algodão.

Correlacionando com a composição química da cera removida pelos solventes de diferentes polaridades, é possível afirmar que nas folhas de soja há uma maior concentração de hidrocarbonetos de cadeia longa (Tabela 4), facilitando a maior aderência e impedindo que haja uma uniformidade na distribuição dos conídios, já que os conídios foram aplicados somente com água sem nenhum tensioativo e estes são hidrofóbicos (Boucias et al., 1988; Shan et al., 2011), logo, haverá mais afinidade para aderirem nas folhas de soja do que na do algodão devido sua composição química.

A germinação de conídios e o desenvolvimento foram avaliados microscopicamente e a interpretação dos resultados mostraram que dependendo do isolado a composição da cera epicuticular influencia negativamente na germinação do fungo. Os extratos extraídos pelo solvente etanol claramente foi o que mais influenciou negativamente na germinação do fungo em ambas as culturas, pois o mesmo apresentou o maior número de componentes químicos e a predominância do D-manitol e β -amyrin (Tabela 4). O D-manitol é um carboidrato natural encontrado em diversos vegetais, como beterraba, cebola, aipo, figo e azeitonas. Além disso,

está presente em alguns exsudatos de árvores e algas marinhas, dos quais pode ser obtido por meio de extração com álcool e pode ser utilizado em diversos campos, incluindo alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e têxteis (Oliveira & Ferreira, 2009). Trost e colaboradores, 2009, utilizando o D-manitol como material de partida sintetizaram o Estreptazolina que apresenta promissoras atividades antifúngicas e antibacterianas. Ayres et al., 2009, isolaram compostos químicos dos extratos obtidos das folhas de *Terminalia fagifolia*, e o fracionamento do extrato etanólico das folhas permitiu a identificação do β -Amyrin, levantando a hipótese de que as atividades farmacológicas, tais como antifúngica atribuídas ao gênero da planta pode ser por conta da presença dessa substância. Atrelando esses resultados aos encontrados no presente trabalho, a alta concentração desses compostos nos estratos etanólicos de ambas as culturas (algodão e soja) pode justificar baixa germinação do fungo. Outro ponto são alguns açúcares presente nas folhas que podem auxiliar na defesa contra fitopatógenos como o D-Pinitol encontrado em nossos resultados na soja no extrato etanólico, esse açúcar pode exercer muitas funcionalidades, dentre elas desempenha funções fisiológicas na soja para adaptação ao estresse por seca e salinidade, estabilização de membrana, alteração osmótica e proteção contra o fungo oídio (*Podosphaera xanthii*) (Chen et al., 2014).

Um estudo aprofundado do efeito de compostos cuticulares de plantas em fungos entomopatogênicos foi relatado por Inyang et al. (1999). Extraídos de nabo (*Brassica rapa* var. *rapa* L.), repolho chinês e colza tiveram efeitos estimuladores e inibitórios na germinação de conídios. A germinação *in vivo* na cutícula foliar foi estimulada pela desparafinação das superfícies foliares. Houve também germinação de conídios significativamente maior em folhas de nabo jovens (77%) versus velhas (40%). Os autores levantaram a hipótese de que para evitar os efeitos dos extraídos cuticulares das folhas na germinação e fixação dos conídios em campo, deve-se investir em aumento de dose e formulações do fungo em campo.

Baverstock et al., 2005, relataram a resposta do fungo entomopatogênicos *Pandora neoaphidis* para voláteis de plantas quando atacadas por pulgões e indicaram que nem a esporulação *in vivo*, o tamanho dos conídios nem o crescimento *in vitro* de *P. neoaphidis* foram afetados pelos voláteis de *Vicia faba* induzidos pelos pulgões (*Acyrtosiphon pisum*). A ausência de um efeito de voláteis de plantas quando atacadas pelos pulgões no crescimento micelial pode ter sido resultado do fungo: não detectar os voláteis, detectar, mas não responder aos voláteis ou, detectar, mas não ser capaz de responder aos voláteis. No estudo de Brown et al. (1995), os voláteis das folhas verdes liberados das folhas maceradas do tabaco reduziram significativamente a taxa de crescimento *in vitro* do micélio de *P. neoaphidis*. Esses voláteis de folhas verdes continham aldeídos de cadeia curta, que são usados pelas plantas como defesa

contra fungos fitopatogênicos (Zeringue & McCormick, 1989). Brown et al. (1995) explicaram o crescimento reduzido de *P. neoaphidis* como resultado dos voláteis terem um efeito subletal sobre o fungo.

É evidente que as plantas podem ter efeitos indiretos sobre fungos entomopatogênicos, alterando a qualidade do hospedeiro, bem como efeitos diretos sobre os próprios fungos (Costa & Gaugler, 1989). De fato, no trabalho de suscetibilidade de lagartas alimentadas com folhas de diferentes culturas, a virulência do fungo foi afetada pelo tipo de substrato alimentar. Poprawski & Jones, 2000, mostraram que a germinação de *Cordyceps fumosorosea* e *B. bassiana* foi consideravelmente reduzida na cutícula de insetos criados em algodão, e os autores sugeriram que era o resultado a uma resposta fungistática de uma substância química secundária produzida pelo algodão. Por essa razão, as implicações para um controle efetivo com fungos entomopatogênicos, deveria levar em consideração a variedade de plantas. Esse tipo de pesquisa ainda precisa ser expandido para outras culturas e variedades para que esse tópico seja mais aprofundado e promovam um manejo de forma eficiente e segura ao ambiente.

Embora os resultados discutidos acima corroborem com os encontrados nos experimentos com os extraídos das folhas de algodão e soja, do ponto de vista prático e considerando que uma alta prevalência de *M. rileyi* tem sido observada em culturas economicamente importantes, como soja, algodão, amendoim e milho (Corrêa-Ferreira & Smith, 1975; Devi et al., 2003, 2007; Firake & Behere, 2020), entender qualquer efeito dos compostos cuticulares dessas plantas onde ocorre epizootias naturais do fungo, deve ser considerado, principalmente se a germinação de esporos na cutícula e a penetração no inseto forem afetadas, isto só se tornará biologicamente significativo se resultar num aumento ou diminuição da infecciosidade do fungo.

5. CONCLUSÃO

Em síntese, este estudo enfatiza a relevância dos estudos de interações entre fungos entomopatogênicos e plantas, com destaque para o *M. rileyi*, no controle de pragas agrícolas, explorando suas interações com plantas de algodão e soja. Extratos obtidos com clorofórmio e hexano, influenciaram positivamente a aderência dos conídios, enquanto extratos obtidos pelo etanol influenciaram negativamente. A composição química diferenciada entre folhas de algodão (presença de glucose e lanostra) e soja (presença de ácido butanoico e D-pinitol) possivelmente impactou na germinação, sendo está mais favorecida pelos extratos obtidos das folhas de soja, para alguns isolados. Essas descobertas fornecem percepções aprofundadas fundamentais para a compreensão das interações tritróficas entre fungos entomopatogênicos, plantas e pragas, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no controle biológico de artrópodes em cultivos agrícolas.

REFERÊNCIAS

- Ayres, M. C. C., Chaves, M. H., Rinaldo, D., Vilegas, W., Vieira Júnior, G. M. 2009. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifoli*. **Química Nova**, v. 32, p. 1509–1512.
- Bianchi, G. Plant waxes. 1995. In: Hamilton, R.J. (Ed.), *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. The Oily Press, Dundee, Scotland, pp. 175–222.
- Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I., Wilhelmi, H., 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.126, p. 237–260.
- Baverstock, J., Elliot, S. L., Alderson, P. G., Pell, J. K. 2005. Response of the entomopathogenic fungus *Pandora neoaphidis* to aphid-induced plant volatiles. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, p. 157–164.
- Blakeman, J. P. 1993. Pathogens in the foliar environment. **Plant Pathology**, v. 42, p. 479–493.
- Boucias, D. G. Pendland, J. C. 1991. **Attachment of Mycopathogens to Cuticle. The Initial Event of Mycoses in Arthropod Hosts**. In: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Cole, G.T., Couch, H.C. (Eds.). Springer Science. pp. 101- 127.
- Carruthers Soper, R. S. 1987. **Fungal diseases**. In: *Epizootiology of insect diseases*. Fuxa, J. R. & Tanada, Y. (Eds.) John Wiley & Sons. pp. 357-416.
- Cerritos-Garcia, D. G., Avery, P. B., Martini, X., Candian, V., Cano, L. M., Cave, R. D. 2021. In vitro effects of leaf extracts from Brassica rapa on the growth of two entomopathogenic fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 779.
- Chen, J., Fernandez. D., Wang, D. D., Chen, J. Y., Dai, G. D. 2014. Biological control mechanisms of D-pinitol against powdery mildew in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 88, p. 52-60.
- Clifton, E. H., Castrillo, L. A., Gryganskyi, A., Hajek, A. E. 2019. A pair of native fungal pathogens drives decline of a new invasive herbivore. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, p. 9178-9180.
- Corrêa-Ferreira, B. S., Smith, J. G. 1975. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner in Paraná. **Florida Entomologist**, v. 58, p. 280.
- Cory, J., Ericsson, J. D. 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. **BioControl**, v.55, p. 75-88.
- Duetting, P. S., Ding, H. J., Neufeld, S. D. E. 2003. Plant waxy bloom on peas affects infection of pea aphids by *Pandora neoaphidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, p. 149–58.

Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., Wraight, S. P. 2015. Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 68-72.

Feng, M. G. Nowierski, R. M. Johnson J. B., Poprawski., T. J. 1992. Epizootics caused by entomophthoralean fungi (Zygomycetes, Entomophthorales) in populations of cereal aphids (Hom., Aphididae) in irrigated small grains of southwestern Idaho, USA. **Journal of Applied Entomology**, v.113, p. 376-390

Firake, D. M., Behere, G. T. 2020. Natural mortality of invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize agroecosystems of northeast India. **Biological control**, p.148.

Goble, T. A., Costet, L., Robène, I., Nibouche, S., Rutherford, R. S., Conlong, D. E., & Hill, M. P. 2012. *Beauveria brongniartii* on white grubs attacking sugarcane in South Africa. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, p. 225-236.

Guedes, C. A. J., Alves-Filho, G. E., Rodrigues, S. H. T., Silva, S. F. M., Souza, D. V. F., Silva, A. M. L., Alves, E. R., Canuto, M. K., Brito, S. E., Pessoa, O. C., Nascimento, F. R., Zacolo, J. G. 2018. Metabolic profile and cytotoxicity of non-polar extracts of pineapple leaves and chemometric analysis of different pineapple cultivars. **Industrial Crops & Products**, v. 124, p. 466-474.

Haar, P. J., Bowling, R., Gardner, W. A., Buntin, G. D. 2018. Epizootics of the Entomopathogenic Fungus *Lecanicillium lecani* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in Sugarcane Aphid (Hemiptera: Aphididae) Populations Infesting Grain Sorghum in Georgia and Texas1. **Journal of Entomological Science**, v. 53, p. 104-106.

Hountondji, F. C. C., Sabelis, M. W. R., Hanna, A. J. 2005. Herbivore-induced plant volatiles trigger sporulation in entomopathogenic fungi: The case of *Neozygites tanajoae* infecting the cassava green mite. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 1003–21.

Inyang, E. N., Butt, T. M., Beckett, A., Archer, S. 1999 The effect of crucifer epicuticular waxes and leaf extracts on the germination and virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, v. 103, p. 419-426.

Inyang, E. N., Butt, T. M., Ibrahim, S. J., Clark, B. J., Pye, A. Beckett, S. Archer. 1998. The effect of plant growth and topography on the acquisition of conidia of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* by larvae of *Phaedon cochleariae*. **Mycological Research**, v. 102, n.11, p.1365–1374.

Inyang, E. N., Alastair, H. M., Ben, O., Ibrahim, L., Pye, B. J. Archer, S. A. Butt, T. M. 2000. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. **Mycological Research**, v. 104, n. 6, p. 653–661.

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Johnson, D. L. 2004. Persistence of entomopathogenic fungi in soil ecosystems. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p.93-98.

Koch, K., Barthlott, W. 2006. Plant Epicuticular Waxes: Chemistry, Form, Self-Assembly and Function. **Natural Product Communications**, v. 1, n.11, p. 1067-1072.

Quattlebaum, E. C., Carner, G. R. 1980. A technique for preparing *Beauveria* spp. for scanning electron microscopy. **Canadian Journal of Botany**, v. 58, n. 15, p. 1700-1703.

Meyling, N. V., Eilenberg, J. 2006. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 37, p. 143-156.

Oliveira, P. S. M., Ferreira, V. F. 2009. Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 441-452.

Parente, R. C. P. **Aspectos da análise de resíduos**. 1984. 118f. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/USP, Piracicaba.

Pava-Ripoll, M., Angelini, C., Fang, W., Wang, S., Posada, F.J., St Leger, R. 2011. The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. **Microbiology**, v. 157, p. 47–55.

Poprawski, T. J., Jones, W. J. 2000. Host plant effects on activity of the mitosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against two populations of *Bemesia* whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Mycopathologia**, v. 151, p. 11–20.

Quesada-Moraga, E. 2020. Entomopathogenic fungi as endophytes: their broader contribution to IPM and crop production. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 9, p. 864-877.

SAS Institute. 2009. SAS® User's Guide, version 8.1, SAS Institute Inc, Cary, NC.

Shan, H., Zhong-Kang, W., Huan C., Meng, W., You-Ping, Y. 2012. Cloning and expression analysis of an hydrophobin gene Nrhyd in *Nomuraea rileyi*. **Mycosystema**, v. 31, p. 350-358.
Shapiro, S. S. Wilk, M. B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, v.52, p.591-611, 1965.

Smith, D., Onions, A. H. S. 1983. “**The Preservation and Maintenance of Living Fungi.**” Commonwealth Mycological Institute.

Sosa-Gómez, D. R. Silva, J. J. 2002. **Fungos entomopatogênicos: Catálogo de Isolados**. Documentos 188: EMBRAPA, Londrina, PR, p. 32.

Sosa-Gómez, D. R., 2012. **Implications of host plants and insect nutrition on entomopathogenic diseases**. In: Panizzi, A.R. Parra, J. R. P. (Eds.) *Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management*. CRC Press, Boca Raton, pp.195-209.

Sosa-Gómez, D. R., Boucias, D. G., Nation, D. J. L. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of invertebrate Pathology**, v.69, p.31–39.

Sosa-Gómez, D. R., López Lastra, C. C., Humber, R. A. 2010. An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil. **Mycopathologia**, v. 170, n.1, p. 61-76.

Steel, R. G. D. Torrie, J. H. 1960. Principles and Procedures of Statistics with Special Reference to the Biological Sciences. McGraw Hill, p. 187-287.

Szafranek, B. M., Synak, E. E. 2006. Cuticular waxes from potato (*Solanum tuberosum*) leaves. **Phytochemistry**, v. 67, p. 80–90.

Trost, B. M., Chung, C. K., Pinkerton, A. B. 2004. Stereocontrolled Total Synthesis of (+) - Streptazolin by a Palladium-Catalyzed Reductive Diyne Cyclization. **Angewandte Chemie International**, v. 43, p. 4327-4329.

Tukey, J. W. 1949. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, v.5, p.232-242.

Van-Den, D. H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p.463-471.

Wösten, H. A. B., De-Vocht, M. L. 2000. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 2, p. 79-86.

Wösten, H. A. B. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 625-646.

Wu, S., Toews, M. D., Oliveira-Hofman, C., Behle, R. W., Simmons, A. M., Shapiro-Ilan, D. I. 2020. Environmental tolerance of entomopathogenic fungi: A new strain of *Cordyceps javanica* isolated from a whitefly epizootic versus commercial fungal strains. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 711.

Ugine, T. A., Wraight, S. P., Sanderson, J. P. 2007. Effects of manipulating spray-application parameters on efficacy of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* infesting greenhouse impatiens crops. **Biocontrol Science and Technology**, v.17(2), p. 193–219.

Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n.6, p. 553-596.