

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA FLORESTAL
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

FLAVIA GALVAN TEDESCO

**FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLO COM PLANTIO DE
EUCALIPTO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

DOIS VIZINHOS

2015

FLAVIA GALVAN TEDESCO

**FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLO COM PLANTIO DE
EUCALIPTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia Florestal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Michele Potrich

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nédia de Castilhos Ghisi

DOIS VIZINHOS

2015

T256f Tedesco, Flavia Galvan
Fungos entomopatogênicos em solo com plantio de eucalipto / Flavia Galvan Tedesco – Dois Vizinhos: [s.n], 2015.
42f.:il.

Orientadora: Michele Potrich
Co-orientadora: Nédia de Castilhos Ghisi
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Engenharia Florestal. Dois Vizinhos, 2015.
Bibliografia p.38-42

1.Fungos entomopatogênicos 2.Fungos do solo
3.Eucalipto I.Potrich, Michele, orient. II.Ghisi, Nédia de Castilhos, co-orient. III.Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. IV.Título
CDD: 634.9

Ficha catalográfica elaborada por Rosana Oliveira da Silva CRB: 9/1745

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



TERMO DE APROVAÇÃO

FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLO COM PLANTIO DE EUCALIPTO

por

FLAVIA GALVAN TEDESCO

Este Trabalho de Conclusão de Curso II foi apresentado em oito de dezembro de dois mil e quinze como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro Florestal. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr^a. Michele Potrich
Orientador(a)

Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia
Membro titular (UTFPR)

Eng. Florestal Aline Mara dos Santos Telles

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso –

Dedico este trabalho à minha mãe Lourdes Galvan Tedesco, ao meu pai Jossimar Tedesco e ao meu irmão Douglas Galvan Tedesco.

AGRADECIMENTOS

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

À Deus, pelas bênçãos e proteção diária.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Michele Potrich, pelo conhecimento que me transmitiu nesta trajetória, também pela imensa dedicação e grandes ideias que me passou. Agradeço não só pelos momentos de orientadora, mas igualmente naqueles em que foi amiga e conselheira, por cada palavra, conversa, puxão de orelha, risadas e choros que ficaram guardados para sempre.

Agradeço a minha Co-Orientadora Prof^a. Dr^a. Nédia Ghisi também por transmitir sabedoria e conhecimento, pela dedicação com o qual me orientou neste trabalho de conclusão. Pelas conversas, risadas e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia, por todas as ajudas e conhecimento transmitido, pelo incentivo, bem como na avaliação como banca. Pelas aulas extras de genética e por toda confiança.

Agradeço a Aline Mara dos Santos Telles, pelas ajudas no início do desenvolvimento deste trabalho, por ter aceito ser banca de meu trabalho em sua primeira etapa, e principalmente por ter aceitado ser banca de meu trabalho final. Também pelas risadas e amizade em todo este tempo de trabalho juntas no Laboratório, pelas vezes que não foi apenas amiga, mas também irmã, me animou quando eu desanimei.

Agradeço todos os professores que passaram por minha vida, por me auxiliarem e darem motivos para seguir em frente.

Aos meus amigos do Laboratório de Controle Biológico que me auxiliaram na montagem dos experimentos, e também pelas risadas e descontrações nos corredores.

A minha amiga Ionara Barbian Urio Domingos, pelas ajudas na montagem dos experimentos de biologia molecular, pelas explicações, também pelas risadas descontrações e conselhos em todo o tempo que passamos juntas.

A minha amiga Naiany Margreiter que seguiu comigo por todos os anos do curso, pelos auxílios, ajudas nos trabalhos e no TCC, pelas risadas e até mesmo nas angustias, meu muito obrigada por todas as conversas, momentos alegres e até mesmo nas lágrimas, pelo ombro amigo e por todos os momentos juntas, muito obrigada.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio, a minha amada mãe Lourdes Galvan Tedesco, ao meu pai Jossimar Tedesco e ao meu irmão Douglas Galvan Tedesco por toda a ajuda, confiança, amor, paciência e dedicação que tiveram comigo neste período tão importante na minha vida. Muito obrigada eu amo vocês.

A todos os meus amigos que me apoiaram, deram forças e torceram por mim, também agradeço pelas risadas e descontrações dos fins de semana. Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Feliz do homem que encontrou a sabedoria, daquele que adquiriu a inteligência,
porque mais vale esse lucro que o da prata, e o fruto que se obtém é melhor que o
fino ouro. ”

Provérbios 3:13-14.

RESUMO

TEDESCO, F.G. **FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLO COM PLANTIO DE EUCALIPTO**: 2015. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2015.

Dentre os agentes de controle biológico, os fungos entomopatogênicos podem controlar infestações de insetos que prejudicam a produção no setor florestal e estes fungos podem ser encontrados em diferentes tipos de solo. No sentido de identificar fungos entomopatogênicos em áreas de florestas plantadas, este trabalho teve como objetivo identificar morfologicamente e molecularmente, fungos entomopatogênicos do solo de plantios de eucalipto. Para isto, foram coletadas amostras de solo de dez propriedades nas cidades de Ampére e Dois Vizinhos, ambas no estado do Paraná. Em cada propriedade foram retiradas cinco amostras de solo, cada uma destas amostras foi composta por duas subamostras de um grama cada. Em laboratório estas subamostras foram diluídas três vezes, até 10^{-2} . A última diluição foi utilizada para preparar os bioensaios, sendo que de cada subamostra foram realizadas três replicatas. O bioensaio foi preparado utilizando-se meio de cultura tipo BDA (batata, dextrose e ágar). Os bioensaios foram acondicionados em B.O.D. ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ e U.R. de 12 horas de fotofase), depois de sete dias os fungos foram raspados e identificados microscopicamente. Para a identificação utilizou-se, corante azul de metileno, espalhando-se o fungo e recobrimo com lamínula. O material foi observado em microscópio de luz (Alltion, objetiva 640) e comparado com entomopatógenos da literatura. Posteriormente estes fungos foram submetidos à análise molecular através da técnica de PCR-ISSR, com os *primers* 5'BDB (ACA)₅, 5'DD (CCA)₅ e 5'VHV (TGT)₅. Realizou-se a eletroforese para se verificar a amplificação do DNA dos fungos com os referidos *primers*. A partir da análise microscópica verificou-se a presença de fungos entomopatogênicos, os quais são provenientes das propriedades 1, 2, 4, 6, 7 e 10. Nas propriedades 1 e 2, ambas localizadas na cidade de Ampére-PR, identificou-se, morfologicamente, a espécie *Metarhizium anisopliae*, sendo encontrado um isolado em cada propriedade. Nas propriedades 4, 6 e 7 foi identificada a espécie *Beauveria bassiana*, ambas as propriedades são localizadas em Ampére, sendo um isolado na propriedade 4, dois isolados da propriedade 6 e também dois isolados da propriedade 7. Dois isolados da espécie *Isaria fumosorosea* foram encontrados na propriedade 10, situada na cidade de Dois Vizinhos-PR. A caracterização molecular dos fungos entomopatogênicos mostrou a similaridade entre indivíduos de espécies diferentes, o que pode ter vindo a acontecer por existir poucos indivíduos amostrais, ou por a caracterização ter sido somente morfológica antes da molecular. Existindo diversidade de espécies entomopatogênicas em solos com plantio de eucalipto, será vantajoso para a própria cultura, pois assim espécies pragas podem ser controladas naturalmente pelos fungos que estão presentes no solo da própria cultura, dispensando a necessidade de inseticidas químicos.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*. Solo. Biologia Molecular.

ABSTRACT

Tedesco, F. G. ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN SOIL WITH EUCALYPTUS PLANTATION: 2015. 42f. Work Completion of course (Diploma in Forestry) - Federal Technological University of Paraná. Dois Vizinhos, 2015.

Among the biological control agents, entomopathogenic fungi can control infestations of insects that harm production in the forest sector and these fungi can be found in different types of soil. To identify entomopathogenic fungi in areas of planted forests, this study aimed to identify morphologically and molecularly, entomopathogenic soil fungi of eucalyptus plantations. For this, soil samples were collected from ten properties in the cities of Ampere and Dois Vizinhos, both in the state of Parana. In each property were removed five soil samples, each of these samples was composed of two subsamples of one gram each. In laboratory these sub-samples were diluted three times, up to 10^{-2} . The last dilution was used to prepare bioassays, and each subsample was three replicates. The bioassay was prepared using culture media like PDA (potato, dextrose and agar). Bioassays were placed in B.O.D. (27 ± 2 ° C, $70 \pm 10\%$ RH and 12 hours fotofase), after seven days, the fungi were identified microscopically and scraped to this, a drop of methylene blue dye was placed, with a pipette on a microscope slide for spreading the fungus in liquid with of a platinum needle, and covering the material with cover slip. The material was observed under light microscope (Alltion, objective 640) and analyzed with the material described in Alves, 1998, ch. Entomopathogen characterization. Later these fungi were subjected to molecular analysis by PCR-ISSR technique, with *primers* 5'BDB (ACA) 5, 5'DD (CCA) and 5 5'VHV (TGT) 5. And so it was possible to perform electrophoresis to verify the amplification of the DNA of the entomopathogenic fungi. From microscopic analysis verified the presence of entomopathogenic fungi, which are derived from properties 1, 2, 4, 6, 7 and 10. All properties 1 and 2, both located in the city of Ampere-PR was identified morphologically, the *M. anisopliae* species being found one isolated each property. In the properties of 4, 6 and 7 was identified species *B. bassiana*, the property having one isolated 4, two isolates in property 6 and also two isolated in property 7. The species of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* was found in two strains of ownership 10, in the city of Dois Vizinhos-PR. The molecular characterization of entomopathogenic fungi showed the similarity between individuals of different species, we can point out that there have been sampled individuals. Existing diversity of entomopathogenic species in soils with eucalyptus, will be good for one's own culture. For thus pest species may be controlled by the fungi that are naturally present in soil culture itself.

Keywords: *Beauveria bassiana*. Soil. Molecular Biology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.1.1 Objetivos Específicos.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 PRODUÇÃO DE EUCALIPTO	14
2.1.1 Insetos Pragas do Eucalipto	15
2.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	16
2.2.1 Ocorrência de fungos entomopatogênicos em insetos e no solo.....	17
2.3 BIOLOGIA MOLECULAR.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOLO e PREPARO DAS SOLUÇÕES	21
3.3 ISOLAMENTO DE FUNGOS DO SOLO	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS DO SOLO	27
5 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O plantio de eucalipto tornou-se uma importante atividade no Brasil, pois traz recursos financeiros e desenvolvimento social, bem como conservação ambiental. A eucaliptocultura é uma alternativa promissora no que se refere ao uso da madeira, por apresentar boas características e versatilidade em relação à substituição de produtos oriundos de fontes não renováveis e, com as florestas plantadas consegue-se minimizar a pressão sobre as florestas nativas (FERBASA. 2011, s/p). A área ocupada por plantios de florestas de eucalipto, até 2012, era de 5.102.030 hectares, sendo um total de 76,6% das silviculturas (ABRAF, 2013, p. 30).

A proximidade taxonômica, morfológica e fisiológica do eucalipto com diferentes espécies brasileiras, por este pertencer a família Myrtaceae, a qual possui muitos indivíduos no país, favoreceu a adaptação de alguns insetos a esta espécie. Junto à disponibilidade de alimento, a baixa heterogeneidade dos plantios interferiu no equilíbrio ecológico destes insetos, possibilitando um aumento populacional descontrolado, incorporando-os ao status de pragas (QUEIROZ; BARBOSA 2014, s/p).

O controle de pragas florestais é realizado, muitas vezes, com a utilização de inseticidas químicos, o que gera elevados gastos e contaminação do solo e da água pelos produtos. Uma alternativa para diminuir custos e contaminações é o controle biológico, onde este acontece naturalmente no ambiente.

A ocorrência natural de entomopatógenos acarretando doenças em populações de artrópodes, em muitos casos, é expressiva e contribui para a redução da aplicação de inseticidas químicos (ALVES et al., 2008). Entre estes, os fungos possuem vantagem sobre os demais micro-organismos, pois conseguem manter-se no solo e/ou na água como saprófitos e eventualmente parasitar insetos (MOREIRA, 2014, p. 234).

Os fungos entomopatogênicos, ao entrarem em contato com os insetos, penetram o corpo via tegumento e via oral, resultando na morte do inseto. A morte destes vem a partir de uma série de mudanças, como o bloqueio do sistema digestivo devido ao crescimento vegetativo do fungo, produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocele e ação histolítica (ALVES, 1998, p.300).

Rodrigues e Loureiro (2009) verificaram a ocorrência natural de fungos entomopatogênicos em solo de culturas agrícolas e área de preservação ambiental, além da ocorrência em insetos. No entanto, essa ocorrência pode ser afetada pela contínua utilização de inseticidas, fungicidas e herbicidas, associados também às condições edafoclimáticas desfavoráveis.

Para conseguir identificar os fungos entomopatogênicos encontrados no solo, os quais são realmente desejados, pode-se utilizar técnicas de caracterização morfológica e também técnicas de Biologia Molecular. A caracterização morfológica é de suma importância para que se consiga classificar somente os fungos de interesse, ou seja, separar entomopatogênicos de não entomopatogênicos.

Já com a biologia molecular, a extração de DNA dos fungos, pode auxiliar na identificação dos fungos presentes no solo. O sequenciamento de locais específicos do genoma, como por exemplo ITS (*Internal Transcribed Spacer*), pode ser utilizado na taxonomia molecular para distinguir a espécie com que se está trabalhando (DOLINSKY, 2007, p.22).

Outros métodos moleculares sem sequenciamento, como o ISSR (“Inter Simple Sequence Repeat”), servem para identificação de micro-organismos, permitindo ainda o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises filogenéticas, epidemiologia e genética de populações (AZEVEDO; ARAÚJO; INÁCIO, s/a, p. 12). Com a utilização da técnica da biologia molecular pode-se então distinguir espécies de fungos entomopatogênicos encontrados em solo com plantio de eucalipto.

1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar fungos entomopatogênicos do solo em plantios de eucalipto.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Identificar, morfológicamente, os fungos entomopatogênicos encontrados no solo em propriedades com plantios de eucalipto.
- Caracterizar, molecularmente, os fungos entomopatogênicos encontrados no solo em propriedades com plantio de eucalipto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE EUCALIPTO

O eucalipto tem ocorrência natural na Austrália e foi introduzido no Brasil em 1904 (FLORESTAR, 2006, s/p). O objetivo da introdução da espécie no país era suprir as necessidades de lenha, postes e dormentes das estradas de ferro, na região sudeste do Brasil (DOSSA; BELLOTE; RODIGHERI, 2002, p. 2).

Um dos principais fatores que determinaram a expansão do eucalipto no mercado foi a produtividade, devido seu rápido crescimento. Ainda que a produtividade média anual de 35 m³/há/ano seja considerada baixa, existem plantios com o uso de eucaliptos adaptados as condições ambientais do país, e melhorados geneticamente juntamente com uma boa tecnologia e bom manejo atingindo rendimentos próximos a 60 m³/ha/ano (DOSSA; BELLOTE; RODIGHERI, 2002, p. 2).

Mesmo com alguns entraves, a eucaliptocultura tornou-se uma importante atividade no Brasil, pois é fonte de recursos financeiros e desenvolvimento social, bem como de conservação ambiental. O cultivo de eucalipto é uma alternativa promissora no que se refere ao uso da madeira, por apresentar boas características e versatilidade (FERBASA, 2011, s/p).

A área ocupada por plantios de florestas de eucalipto e pinus no Brasil, em 2012, totalizou 6.664.812 hectares, sendo que 76,6% (5.102.030 hectares) correspondem à área com plantio de eucalipto (ABRAF, 2013, p. 30).

Associados ao cultivo de eucalipto o registro de insetos é amplo e alguns são considerados pragas. Esses apresentam importância já que grande parte ataca as culturas de eucalipto e geram perdas econômicas. Um dos fatores que facilita a proliferação destes insetos é a monocultura, ou seja, o excesso de alimento para estes, que ocupa extensas áreas (EMBRAPA, 2010, s/p).

2.1.1 Insetos Pragas do Eucalipto

A introdução de pragas exóticas nas últimas duas décadas, no setor florestal brasileiro vem causando muitas perdas na produção do setor (IPEF, 2003, p. 1). A proximidade taxonômica do eucalipto com diferentes espécies brasileiras favoreceu a adaptação de alguns insetos. Juntamente à disponibilidade de alimento que o eucalipto forneceu, a baixa heterogeneidade dos plantios interferiu no equilíbrio ecológico destes insetos, possibilitando um aumento populacional descontrolado, elevando-os ao status de pragas (QUEIROZ; BARBOSA. 2014, s/p).

A denominação inseto-praga vem após a caracterização da injúria, juntamente com um dano econômico, ecológico ou social. Praga-chave é quando o inseto está diretamente associado a uma cultura onde causa injúrias e inviabiliza a produção (MOREIRA, 2014, p. 67). Muitos insetos estão causando danos e comprometendo a produção das florestas de eucalipto, e com isso vem se buscando algumas alternativas de controle para estes insetos.

Alguns dos principais insetos-praga do eucalipto no Brasil são as formigas cortadeiras *Atta* sp. e *Acromyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae), os cupins *Cryptotermes* sp. e *Heterotermes* sp. (Isoptera: Termitidae), as lagartas desfolhadoras *Caligo* sp., *Glena* sp. e *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera), os besouros desfolhadores *Costalimaita* sp. e *Gonipterus* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae), os psilídeos *Glycaspis* sp. e *Mastigimas* sp. (Hemiptera: Psyllidae), o percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), os besouros broqueadores *Platypus* sp. (Coleoptera: Platypodidae) (QUEIROZ; BARBOSA, 2014, s/p).

Como exemplo dos insetos que ocasionam danos à cultura, o percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), inseto sugador, ataca a cultura do eucalipto e, atualmente, é uma das pragas mais importantes dessa cultura. Outro inseto que vem trazendo prejuízo econômico nos plantios florestais são as formigas cortadeiras que devem ser controladas durante todo o projeto de implantação de uma floresta (PRAGAS..., 2007, s/p). A vespa-da-galha, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae), é uma praga com origem australiana, ocasionando desfolha, encarquilhamento e secamento de ponteiros quando presentes nos ramos mais finos, e modificação das folhas quando presentes na nervura central e pecíolo (WILCKEN; FILHO, 2008, p.7).

O controle de populações de organismos vivos por meio de inimigos naturais é chamado de controle biológico, este controle pode ser realizado por uma série de grupos sendo alguns deles: insetos, vírus, fungos e bactérias. Os fungos entomopatogênicos, encontrados naturalmente no ambiente, estão entre os principais agentes de controle biológico de pragas, sendo produzidos em larga escala para comercialização (EMBRAPA, 2006, s/p).

2.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados no controle microbiano. A grande variabilidade genética destes entomopatógenos pode ser considerada a principal vantagem no controle de insetos (ALVES, 1998, p. 289). Os primeiros testes realizados com fungos entomopatogênicos foram realizados no século XIX, pelo russo Metschnikoff que avaliou o potencial do fungo *Metarhizium anisopliae* para o controle de uma espécie de besouro (FARIA; MAGALHÃES, 2001, p. 18).

Devido a existência natural dos fungos entomopatogênicos no ambiente, estes são submetidos a alguns estudos. A natural ocorrência de entomopatógenos causando doenças em populações de artrópodes, em muitos casos, é expressiva e de grande valia, contribuindo para a redução da aplicação de agrotóxicos (ALVES et al., 2008).

Os fungos entram em contato com os insetos penetrando suas cutículas, e uma vez dentro do corpo se multiplicam rapidamente. A morte é causada por uma série de mudanças que acontecem dentro do inseto, sendo algumas delas: mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo e danos físicos, devido ao crescimento do micélio. Eles emergem, frequentemente, do corpo dos insetos para produzir os esporos, que quando disseminados pelo vento, chuva ou contato com outros insetos espalham a infecção (ALVES, 1998, p.300).

Alguns estudos feitos com cochonilha *Orthezia praelonga* (Hemiptera: Ortheziidae), coletados em pomar de laranjeira mostram a presença de fungos do

gênero *Penicillium*, *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Beauveria* e *Lecanicillium*, onde 120 insetos coletados possuíam formação cotonosa do fungo (WEILER, 2011, p.55).

Lorencetti (2013) verificou que isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria* sp. são capazes de promover infecção em adultos de *T. peregrinus*, demonstrando potencial para o controle deste percevejo. A autora destaca ainda a ocorrência natural de *B. bassiana* em insetos de *T. peregrinus*, no estado do Paraná.

Propondo controlar populações de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera, Psyllidae) encontrados nos estados de São Paulo e Paraná, a Embrapa Florestas-Colombo, realizou estudos onde verificaram que *G. brimblecombei* pode ser controlado pelos fungos entomopatogênicos (SANTANA, 2003, p. 2).

2.2.1 Ocorrência de fungos entomopatogênicos em insetos e no solo

O principal reservatório de entomopatógenos para o controle de insetos-praga é o solo (MELO; AZEVEDO, 2000, p.18). Alguns micro-organismos podem estar casualmente presentes na superfície do tegumento dos insetos, isto pode ocorrer devido aos insetos viverem em solos ricos em matéria orgânica. Mas esses micro-organismos também podem estar presentes no interior dos insetos, pois encontram abrigo e alimentos para o seu desenvolvimento (ALVES, 1998, p.80).

A principal característica que os fungos apresentam ao contaminar os insetos-praga é induzir a redução da alimentação do hospedeiro, provocando uma lentidão nos movimentos, no qual o corpo do inseto atacado incha e fica coberto pelo fungo (ALVES, 1998, p. 40-51).

Paecilomyces cateniannulatus mostrou-se capaz de infectar insetos de *T. peregrinus*, este fungo é capaz de penetrar no corpo do inseto pelas aberturas naturais. Esta espécie de fungo entomopatogênico foi obtida a partir de insetos mortos coletados nas folhas de eucalipto (LAZO, 2012, p. 45).

Os fungos entomopatogênicos na maioria das vezes esporulam externamente no corpo do hospedeiro, sob condições de alta umidade e temperatura entre 24°C e 30°C. Em alguns casos, os fungos entomopatogênicos esporulam no interior do abdômen hospedeiro (ALVES; FARIA, 2010, p. 14).

Os fungos entomopatogênicos ocorrem naturalmente em diferentes ordens de insetos, como o fungo vermelho ou *Aschersonia aleyrodis*, que ocorre naturalmente em moscas brancas *Bemisia argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae) e cochonilhas *O. praelonga* (Hemiptera: Ortheziidae), ocasionando a doença na fase imóvel desses insetos (ALVES et al., 2001, p.19).

Em aviários comerciais observou-se ocorrência natural do fungo *M. anisopliae* em cascudinho de aviário *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Posteriormente os corpos dos cascudinhos foram incubados e apresentaram conídios do fungo, que foram isolados e colocados para crescer em meio de cultura (aveia-Dodine®). Estes foram isolados para comprovar a qual gênero os fungos pertenciam (ALVES et al., 2004, p. 794).

Rodrigues e Loureiro (2009) verificaram a presença dos fungos entomopatogênicos *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces farinosus* em amostras de solo, coletadas em matas de preservação ambiental no Município de Dourados e na região do Pantanal-Abobral em Mato Grosso do Sul.

Amostras de solo foram coletadas em sistemas de produção orgânica na cidade de Verê- PR, onde foram encontrados cinco isolados, sendo três isolados do gênero *Metarhizium* sp. e dois isolados do gênero *Isaria* sp. (DALLACORT et al., 2013, s/p).

2.3 BIOLOGIA MOLECULAR

Utilizando a genética clássica, teve-se início a genética molecular, tendo como maior enfoque a estrutura e função dos genes a nível molecular. Utilizando as técnicas de taxonomia molecular pode-se avaliar com qual espécie de fungo se está trabalhando (DOLINSKY, 2007, p.22).

Há alguns anos era possível analisar tecidos somente macroscopicamente ou microscopicamente, com o passar dos anos e o aumento da tecnologia, estes mesmos tecidos passaram a ser analisados através da identificação direta do DNA que os compõem pela aplicação de métodos de biologia molecular (PINHO, 2006, p. 331). Métodos moleculares podem ser úteis para identificação de micro-organismos,

possibilitando ainda o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises filogenéticas, epidemiologia e genética de populações (AZEVEDO; ARAÚJO; INÁCIO, s/a, p. 12).

Na identificação morfológica de fungos levam-se em conta as estruturas reprodutivas. Para essa identificação os fungos devem ser cultivados a partir de colônias puras em meios de cultura e corada com técnicas adequadas para manutenção das estruturas (AZEVEDO; ARAÚJO; INÁCIO, s/a, p. 19).

Algumas técnicas são utilizadas na biologia molecular para se obter a classificação dos fungos, sendo algumas delas: conteúdo de GC do DNA (guanine-cytosine content), DNA-DNA, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) e PCR (reação em cadeia da polimerase), além dos métodos descritos por Aquino de Muro et al. (2005) usando ISSR (inter-simple sequence repeat) e sequenciamento de ITS (internal transcribed spacer).

Carneiro et al. (2008) observaram através de análises que três marcadores RAPD (OPA03-2, OPA13-4 e OPA02-8) são associados com a patogenicidade contra *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) e pode ser utilizado para rastrear isolados de *Beauveria*.

Em alguns estudos desenvolvidos na Embrapa, a técnica RAPD selecionou dez oligonucleotídeos que amplificaram 53 bandas das quais 33 foram polimórficas entre os isolados. Esta técnica mostra eficiência em caracterizar variabilidade genética, identificando isolados de *B. bassiana* que foram obtidos em uma mesma localidade (CARNEIRO, 2004, p.8).

Para realizar a classificação dos fungos pode-se utilizar a técnica ISSR, que é utilizada para analisar a variabilidade genética, no qual o marcador molecular amplificará o trecho entre dois blocos de microssatellite, sequências em loco múltiplos ao longo o genoma de um único iniciador composto 16 a 18 pares de base, com comprimento de sequência repetida ancorado no sentido 3' ou 5' por 2-4 nucleotídeos arbitrários (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Os marcadores ISSR são dominantes, e embora sejam reconhecidos como menos polimórficos, evitam os problemas que os alelos nulos de microssatélites poderiam trazer para as análises desejadas. Marcadores ISSR não requerem informações prévias de sequências *primer* de DNA da espécie-alvo, produzem fragmentos com grande reprodutibilidade, quando comparados a outros marcadores

com base em PCR não-específico como RAPD, por exemplo, e requerem pouca infraestrutura em termos de equipamento (SOUZA et al. 2008).

Em alguns estudos utilizando a técnica ISSR foi possível observar a considerável variabilidade entre isolados de *Beauveria* de diferentes localizações geográficas, mostrando alto nível de polimorfismo a nível de DNA (WANG et al., 2005, p. 1370).

Outro marcador molecular utilizado para separar espécies é o sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer), que separa os genes do rDNA e que pode ser amplificada com primers específicos ancorados nessas duas regiões. Essa região é conservada, mas alterável entre diferentes espécies, o que permite a descrição a um grau específico (FUNGARO, 2000).

Uma das características que as regiões ITS apresentam, é que estas proporcionam entre 600 e 800 pares de bases, podendo ser amplificadas, utilizando os primers universais, os quais irão complementar às sequências conservadas dos genes que codificam o rRNA (BARBOSA, s/a, s/p).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico I da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV). As amostras de solo foram coletadas em dez propriedades, sendo oito na cidade de Ampére e duas em Dois Vizinhos (Paraná). As análises de biologia molecular também foram realizadas na UTFPR-DV, sendo estas efetivadas no Laboratório de Controle Biológico II, Sala de Biologia Molecular.

3.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOLO E PREPARO DAS SOLUÇÕES

As coletas de solo foram realizadas em plantios de eucalipto com diferentes idades, pois os mesmos já se encontravam implantados nas propriedades. Em cada propriedade foram coletadas cinco amostras de solos, estas amostras foram coletadas de forma aleatória abrangendo todo o povoamento. Estas amostras foram retiradas a 30 centímetros de profundidade do solo, utilizando-se, para isto, uma faca para perfurar o solo. A primeira camada de matéria orgânica foi descartada e cada amostra possuiu uma quantidade, aproximada, de 100 gramas.

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e identificadas com o número da propriedade e da amostra correspondente (Figura 1). As propriedades foram enumeradas de 1 a 10, e cada propriedade continha cinco amostras enumeradas de 1 a 5. Após as amostras coletadas e identificadas, as mesmas foram armazenadas em geladeira a 10°C no Laboratório de Controle Biológico II, para manter a integridade das amostras, até a preparação dos bioensaios. Toda amostra de solo possuía duas subamostras de um grama, extraídas das amostras de solo retiradas de cada propriedade.

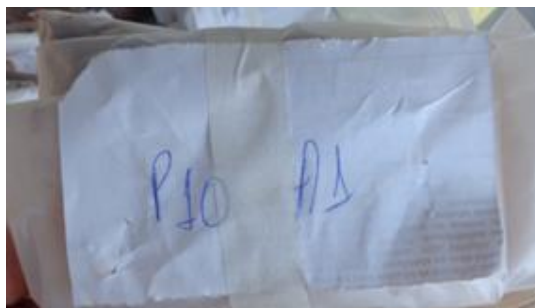


Figura 1 – Amostra de solo após coleta, onde foram embaladas em sacos plásticos e identificados com número de propriedade e amostra.

Fonte: A autora (2015).

Cada grama de solo das subamostras foi diluída em 100 mL de água destilada esterilizada dentro de um erlenmeyer, obtendo-se então a solução padrão. Desta solução foram retirados, com o auxílio de uma pipeta, 10 mL e diluídos em 90 mL de água destilada esterilizada em outro erlenmeyer, obtendo-se então a primeira diluição. Da primeira diluição também foram retirados, com uma pipeta, 10 mL e adicionados em um terceiro erlenmeyer com 90 mL de água destilada esterilizada, preparando a segunda diluição (10^{-2}). Para a preparação dos bioensaios foi utilizada a segunda diluição (Figura 2).

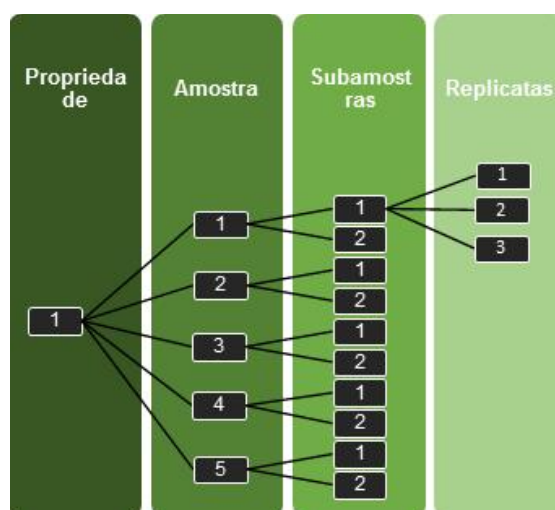


Figura 2 - Representação da obtenção de cada uma das replicatas de solo, provenientes das propriedades com plantio de eucalipto, que foram utilizadas para preparação dos bioensaios.

Fonte: a Autora (2015).

3.2 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para produção e desenvolvimento dos fungos foi BDA (batata 200g, dextrose 20g e ágar 15g). Depois de pronto e esterilizado em autoclave por 15 minutos a 120°C, o meio de cultura foi levado para câmara de fluxo laminar onde recebeu tetraciclina, para evitar o crescimento e desenvolvimento de bactérias. O meio de cultura foi vertido em placas de petri de 12 cm Ø, previamente esterilizadas.

Foram utilizadas 300 placas, sendo que cada uma das amostras possuía duas subamostras que agrupavam três replicatas. Os procedimentos foram realizados em fluxo laminar vertical para evitar contaminações nas amostras.

3.3 ISOLAMENTO DE FUNGOS DO SOLO

A quantidade da solução (solo dissolvido em água a 10^{-2}) aplicada, com o auxílio de uma pipeta em cada uma das placas, foi de 1000µL, sendo que cada uma das diluições apresentou três repetições (três placas), na qual a solução foi distribuída com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Posteriormente, cada placa foi vedada com filme de PVC, identificada e incubada. As placas foram dispostas invertidas dentro da BOD, durante sete dias, a 27°C, com 12 horas de fotofase, para que houvesse o crescimento dos fungos.

Após o crescimento dos fungos, as placas passaram por uma triagem visual, permanecendo somente fungos com características de serem entomopatogênicos. Posteriormente a triagem foram realizadas lâminas desses fungos de interesse para avaliação e identificação microscópica. Para isto, colocou-se uma gota do corante azul de metileno, com o auxílio de uma pipeta, em uma lâmina para microscopia, espalhando o fungo no líquido com o auxílio de uma agulha de platina, e recobrimo o material com lamínula. O material foi observado em microscópio de luz (Alltion, objetiva 640) e analisado com base na literatura, segundo Alves (1998), no capítulo “Fungos Entomopatogênicos”.

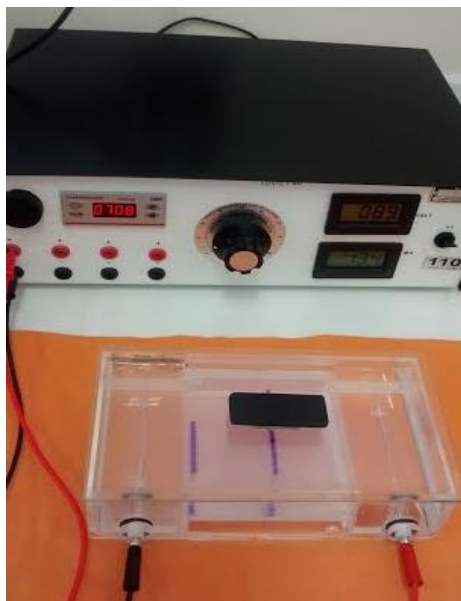
3.4 ANÁLISE MOLECULAR DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Inicialmente foi realizada a extração do DNA, utilizando-se o protocolo do kit Promega®. Para isto, foi adicionado 300µL de EDTA em um eppendorf de 1,5mL, acrescentando-se amostra do fungo entomopatogênico e 0,1g de micropérolas de vidro (*glass beads*) de aproximadamente 0,5 mm de diâmetro no mesmo eppendorf.

Os eppendorfs foram agitados em agitador de tubos tipo vórtex por, aproximadamente, 3 minutos e deixados em temperatura ambiente por 10 minutos com agitação periódica. Posteriormente foram adicionados 300µL de solução de lise nucleica (*Nuclei Lysis Solution*) e 100µL de solução de precipitação de proteína (*Protein Precipitation Solution*) e mais uma vez foram agitados com o auxílio do agitador tipo vórtex por 20 segundos. As amostras ficaram em gelo por cinco minutos e após este processo foram centrifugadas a 15.000 rpm por três minutos. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um novo eppendorf de 1,5mL, contendo 300 µL de isopropanol a temperatura ambiente.

Na sequência, o eppendorf foi invertido com cuidado e, posteriormente, centrifugado a 15.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante foi retirado por inversão e adicionado 300µL de etanol 70%, invertendo-se o eppendorf várias vezes para lavar o pellet, sendo realizada nova centrifugação a 15.000 rpm por dois minutos. O eppendorf permaneceu invertido para retirar o etanol e foi deixado aberto, virado para baixo, em papel filtro por 15 minutos para secar. Foi adicionado 50µL de solução de reidratação de DNA (*DNA Rehydration Solution*) e 1,5µL de solução de RNase (*RNase Solution*) e agitando os microtubos posteriormente em agitador tipo vórtex por um segundo. Os tubos foram centrifugados por cinco segundos e incubados a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, foram incubados a 65°C por 60 minutos em banho-maria, mexendo periodicamente o tubo.

Em uma segunda etapa procedeu-se a quantificação do DNA através da eletroforese a ~80V em gel de agarose 1% por 60 minutos (Figura 3), corando com brometo de etídeo e realizando análise sob luz ultravioleta. Nesta fase pôde-se observar a integridade do DNA, e fazer a quantificação do mesmo. Em seguida, após a obtenção efetiva dos DNA's dos fungos, foi realizada a padronização de todas as amostras de DNA, deixando todas as amostras com a mesma quantidade.



**Figura 3 – Eletroforese a ~80V em gel de agarose 1% por 60 minutos, corrida do DNA dos fungos entomopatogênicos.
Fonte: A autora (2015).**

No processo ISSR-PCR foram utilizados três primers sendo eles: 5'BDB (ACA)₅, 5'DD (CCA)₅ e 5'VHV (TGT)₅ Invitrogen®. A reação foi realizada com um total de 26µl, sendo estes compostos por: 2,5 µl de tampão, 0,5 µl de dnTP, 0,75 µl de MgCl₂, 0,5 µl do primer, 0,2 µl de Taq DNA polimerase, 4 µl de DNA e 17,55 µl de H₂O.

No termociclador (Figura 4) foram adicionados os eppendorfs que continham os compostos citados acima, e estes passaram por um programa de amplificação inicial de 94°C por três minutos, seguidos de 39 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 55°C por um minuto, 72°C por três minutos, posterior aos ciclos, o processo continua com extensão 72°C por 10 minutos e mantendo a 4°C após a conclusão do programa. Após este processo as amostras amplificadas pela PCR seguiram para a eletroforese em gel de 1,2% de agarose, por uma hora e 10 minutos em 60 volts para confirmação de sucesso da PCR. Seguindo o processo o gel foi corado em brometo de etídio por 10 min, após a coloração o gel foi transferido para o transiluminador e fotografado.



Figura 4 – Termociclador, utilizado para realização de desnaturação, pareamento e extensão do DNA, que ocorrem em temperaturas diferentes. Fonte: A autora (2015).

Tentou-se também caracterização molecular dos fungos através da amplificação, pela PCR da região do espaçador transcrito interno (ITS) do rDNA ITS1, 5.8S-ITS2. O volume da reação final foi 25 μ L contendo o DNA genômico, 0,2 μ M do primer forward ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e do iniciador reverse ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') Invitrogen®, 0,4 mM do mix de dNTP; 4 mM MgCl₂; e 1,0 U de Taq DNA Polimerase, no tampão apropriado da enzima (Invitrogen®). As condições de amplificação foram 94°C iniciais a 5 min, e 25 ciclos de 94°C a 30 segundos, 55°C a 45 segundos e 72°C a 1 minuto, como extensão final de 72°C por sete minutos em termociclador. Posteriormente as amostras amplificadas pela PCR-ITS seguiram para a eletroforese em gel de 1,0% de agarose, por uma hora e 10 minutos em 60 volts para confirmação de sucesso da PCR. Após este processo o gel foi corado em brometo de etídio por 10 min, após a coloração o gel foi transferido para o transiluminador e fotografado.

O gel formado para a análise da PCR-ISSR, foi analisado visualmente e dele foi extraído uma estimativa do tamanho das bandas em pares de base, estes dados foram colocados em uma tabela (Tabela 2) a qual possuía dados de ausência e presença de bandas, para então facilitar a contagem das bandas. Posteriormente os dados foram analisados no programa estatístico Past ver. 2.17c com o índice de similaridade de Jaccard, obtendo-se então as estimativas de similaridade. No mesmo programa, elaborou-se um gráfico (similaridade dos indivíduos), como tentativa de formação de grupos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS DO SOLO

Verificou-se com a caracterização morfológica que existe a presença de fungos entomopatogênicos em solo com plantio de eucalipto (Figura.5). Também foi possível através da análise microscópica comprovar que alguns dos fungos encontrados no solo das propriedades com plantio de eucalipto são entomopatogênicos.



Figura 5 – caracterização morfológica dos fungos encontrados em amostras de solo, provenientes de plantios de eucalipto localizados nas cidades de Ampére e Dois Vizinhos no Paraná. Fonte: A autora (2014).

Com o fim da análise microscópica e da comparação com o material já existente em literatura, foi possível observar que existe a presença de fungos entomopatogênicos no solo com plantio de eucalipto. Os fungos de interesse foram encontrados nas amostras de solo provenientes das propriedades 1, 2, 4, 6, 7 e 10 (Tabela 1), existindo a presença dos fungos nas amostras de solo coletadas de ambas as cidades, Ampére-PR e Dois Vizinhos-PR.

Tabela 1 - Relação das espécies de fungos entomopatogênicos, coletados em solo com plantio de eucalipto, provenientes das cidades de Ampére e Dois Vizinhos no Paraná.

Nº Amos. Molecular	Espécie*	Propri.	Amostra da Prop.	Sub Amostra	Repetição	Local de coleta
7	<i>B. bassiana</i>	4	4	1	3	Ampére
8	<i>B. bassiana</i>	6	5	1	3	Ampére
18	<i>B. bassiana</i>	6	5	2	1	Ampére
22	<i>B. bassiana</i>	7	4	1	1	Ampére
23	<i>B. bassiana</i>	7	4	1	3	Ampére
27	<i>I. fumosorosea</i>	10	1	1	3	D. Vizinhos
31	<i>M. anisopliae</i>	2	2	2	2	Ampére
39	<i>M. anisopliae</i>	1	3	2	3	Ampére
41	<i>I. fumosorosea</i>	10	3	2	1	D. Vizinhos

* Identificação morfológica, baseada em Alves, capítulo: Fungos Entomopatogênicos (1998).
Fonte: A autora- 2015.

Nas propriedades 1 e 2, ambas localizadas na cidade de Ampére-PR, identificou-se, morfológicamente, a espécie *M. anisopliae* sendo encontrado um isolado em cada propriedade. Nas propriedades 4, 6 e 7, ambas do município de Ampére, foi identificada a espécie *B. bassiana*, sendo um isolado na propriedade 4, dois isolados da propriedade 6 e também dois isolados da propriedade 7. A espécie de fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* foi encontrada em dois isolados da propriedade 10, situada na cidade de Dois Vizinhos-PR (Tabela 1).

Foi evidenciado uma diversidade de espécies de fungos entomopatogênicos em solos com plantio de eucalipto, sendo positivo para a própria cultura, pois espécies de insetos pragas, que entrarem em contato com este solo, poderão ser controladas, naturalmente.

A ocorrência natural de fungos entomopatogênicos no ambiente é de relevada importância, pois estes entomopatógenos estão entre os principais agentes do controle biológico. Essa importância está relacionada principalmente ao fato destes infectarem os insetos tanto por contato quanto por via oral (ALVES, 1998).

Amostras de solo coletadas em matas de preservação ambiental, no Município de Dourados e na região do Pantanal-Abobral em Mato Grosso do Sul, evidenciaram a presença de duas espécies de fungos: *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces farinosus* (RODRIGUES e LOUREIRO, 2009, p. 305).

Em solos com cultivo orgânico e convencional de videiras, foi possível identificar a ocorrência dos fungos entomopatogênicos *Beauveria* sp. e *Paecilomyces* sp. A ocorrência natural destes fungos no solo pode vir a colaborar para que possam ser reduzidas as aplicações de agrotóxicos na área (BUSETTI et al., 2010, s/p).

Os gêneros *Metarhizium* sp. e *Isaria* sp. também foram encontrados em solos com sistemas de cultivo orgânico, sendo três isolados de *Metarhizium* sp. e dois isolados do fungo *Isaria* sp. (DALLACORT et al., 2013, s/p).

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill. é uma espécie de fungo entomopatogênico que pode ser encontrada naturalmente sobre insetos ou no solo de todos os países. A infecção do fungo em insetos ocorre via tegumento, oral e também pelo sistema respiratório, onde após passadas 12 a 18 horas o fungo irá germinar, este período depende da quantidade de nutrientes (glucose, quitina, nitrogênio, etc.) presente no inseto. Depois de 72 horas, o inseto estará completamente colonizado pelo fungo, morrendo por falta de nutrientes e pelo acúmulo de substâncias tóxicas (ALVES, 1998, p. 312).

A espécie *B. bassiana* pode ser caracterizada devido suas fiáides possuírem a parte basal dilatada findando em forma de zigzag, também por possuir conídios globosos ou subglobosos resultando em densos cachos. Os conídios possuem um tamanho variado entre 2 a 3 x 2 a 2,5 µm (ALVES, 1998, p. 312).

O fungo entomopatogênico *B. bassiana* também apresenta potencial inseticida para ninfas e adultos de *T. peregrinus*. O fungo faz alterar o ciclo de vida do inseto quando aplicado em ninfas, causando a mortalidade destas (SOLIMAN, 2014, p. 81).

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn é da família Moniliaceae, e sua principal característica é infectar inúmeras espécies de insetos. Este fungo pode ser encontrado facilmente na natureza em solos, onde pode sobreviver por longos períodos. A espécie pode ser usada para controlar insetos pragas que causam danos a diferentes culturas (ALVES, 1998, p. 308 e AZEVEDO, 2001, p. 433).

Para a identificação de *M. anisopliae*, são necessárias algumas observações como: os conídios devem apresentar forma cilíndrica, normalmente sendo mais estreitos em seu meio, estes se desenvolvem sobre conidióforos cilíndricos com coloração variando entre branca, verde, marrom e castanho-claro. Os conídios podem apresentar um tamanho entre 3 as 18 µm (ALVES, 1998, p. 306).

M. anisopliae interfere no ciclo biológico de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae), sendo patogênico para as ninfas deste inseto em condições de laboratório, quando pulverizado (DAL POGETTO, 2009, p.72).

O gênero *Isaria* sp. contém diversas espécies consideradas e classificadas como entomopatogênicas, as quais possuem coloração variando de branca, amarela, rosa até avermelhada. Este gênero penetra no corpo dos insetos via tegumento, onde utiliza da pressão física para adentrar. Para a identificação da espécie foi necessário observar se os conídios apresentavam-se de forma alongada e/ou ovoides, sendo de coloração rosa bronzeado a rosa acinzentado, sendo que os conídios e fiálides são lisos (ALVES, 1998, p. 329).

Isolados de *Isaria* sp., fornecidos pelo Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de São Paulo, demonstraram potencial infectivo sobre adultos do percevejo bronzeado do eucalipto *T. peregrinus*, inseto que, em altas infestações, promove a queda das folhas e consequente morte da planta (LORENCETTI, 2013, p.32).

Após o crescimento e a identificação dos fungos, pode-se realizar a verificação microscópica. Assim, somente aqueles com estruturas descritas na literatura foram enviados para a biologia molecular, não sendo necessário realizar a biologia molecular dos fungos que não foram classificados como entomopatogênicos, de acordo com o referenciado em Alves (1998).

4.2 ANÁLISE MOLECULAR DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

A extração de DNA dos fungos entomopatogênicos encontrados no solo, com o protocolo do kit Promega®, foi positiva. Tanto o protocolo e o kit Promega® testados foram bons para a realização de extração de DNA dos isolados fungicos estudados neste trabalho.

Com a realização da técnica PCR-ISSR, foi possível obter resultados de amplificação em apenas um dos três *primers* utilizados para amplificação. O *primer* CCA mostrou resultados positivos na amplificação do DNA dos isolados, no qual os outros dois *primers* ACA e TGG, não geraram qualquer produto de amplificação, ou seja, não foi possível visualizar as bandas de DNA no gel de agarose. Com a prática

da eletroforese pode-se observar os resultados nas figuras abaixo (Figura 6 e Figura 7).

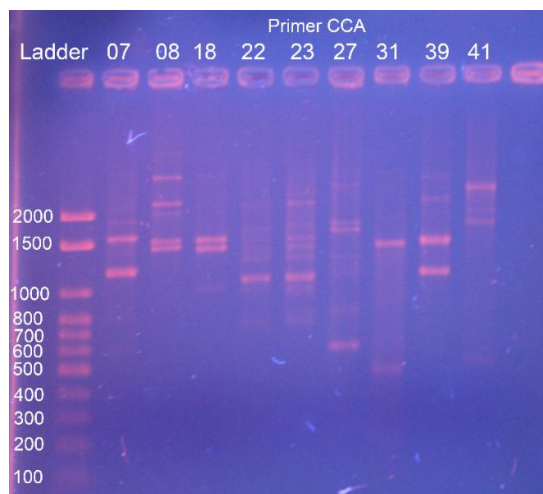


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos entomopatogênicos, com o *primer* CCA. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas, *Beauveria bassiana* representada pela numeração 07, 08, 18, 22 e 23. *Metarhizium anisopliae* pelos números 31 e 39, e *Isaria* sp. 27 e 41. Os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra.

Fonte: A autora (2015).

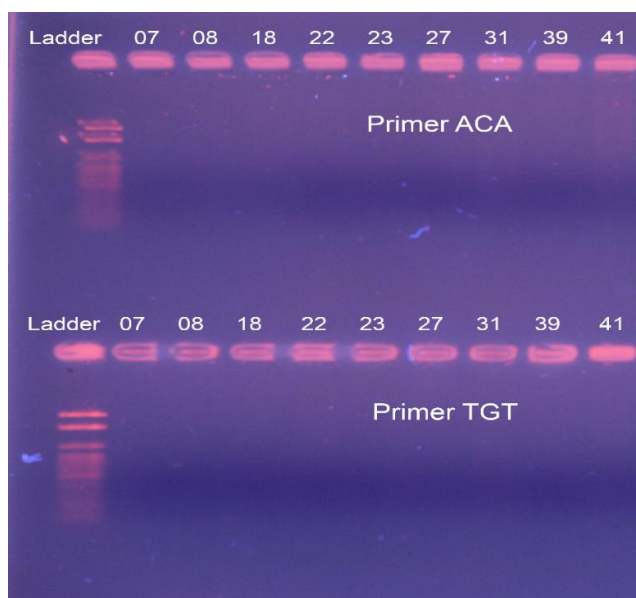


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação negativa do DNA de cada um dos isolados estudados, com os *primers* ACA e TGT. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas, *Beauveria bassiana* representada pela numeração 07, 08, 18, 22 e 23. *Metarhizium anisopliae* pelos números 31 e 39, e *Isaria* sp. 27 e 41.

Fonte: A autora (2015).

No gel de agarose foi realizada a corrida dos DNAs, onde estes são separados por peso molecular, e para se obter estimativa da quantidade de nucleotídeos destes foi colocado o Ladder como gabarito, para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra, na contagem dos pares de base os dados de ausência e presença das bandas formaram uma tabela (Tabela 2), a qual posteriormente foi enviada para a análise estatística, para se obter a porcentagem de similaridade.

Tabela 2: Tabela com valores de ausência e presença das bandas do DNA amplificado pelo primer CCA, sendo o valor 1 para presença e o 0 (zero) para ausência.

Ind.	peso																		
	2500	2400	2300	2200	2100	2000	1900	1800	1700	1600	1500	1400	1200	1100	1000	900	800	600	500
7	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
8	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
23	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
27	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
39	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Fonte: A autora (2015).

O *primer* CCA mostrou-se capaz de amplificar o DNA de fungos entomopatogênicos. Os outros dois *primers* utilizados na PCR-ISSR (ACA e TGT) não se mostraram bons amplificadores, sendo assim, estes primers não são indicados para amplificação de DNA dos fungos entomopatogênicos estudados.

Na Figura 6 pode-se observar a amplificação do *primer* CCA de forma consistente em todos os isolados examinados. Sendo que a contagem dos pares de base de cada uma das amostras foi realizada de forma visual. Com o índice de similaridade de Jaccard foi possível obter uma tabela com o índice de similaridade entre cada um dos isolados de fungos entomopatogênicos estudados no trabalho (Tabela 3).

Tabela 3: Porcentagem de similaridade, obtida pelo índice de Jaccard, existente entre os nove isolados de fungos entomopatogênicos, coletados de solo com plantio de eucalipto.

	Ind_07	Ind_08	Ind_18	Ind_22	Ind_23	Ind_27	Ind_31	Ind_39
Ind_07	1							
Ind_08	0,375	1						
Ind_18	0,28571	0,42857	1					
Ind_22	0,090909	0,18182	0,375	1				
Ind_23	0,23077	0,21429	0,25	0,5	1			
Ind_27	0,090909	0	0	0,16667	0,5	1		
Ind_31	0	0,14286	0,2	0,125	0,083333	0	1	
Ind_39	0,375	0,2	0,25	0,18182	0,13333	0,083333	0	1
Ind_41	0,125	0,11111	0	0	0,15385	0,22222	0,2	0,11111

Fonte: A autora (2015).

Verifica-se na Tabela 3 o índice de similaridade entre cada um dos isolados dos fungos entomopatogênicos analisados. Pode-se observar grande variação no grau de similaridade entre os indivíduos, sendo que em alguns a similaridade é zero e em outros chega a 50%. Com base nestes valores, gerou-se um cladograma de similaridade, para melhor interpretação dos dados (Figura 8).

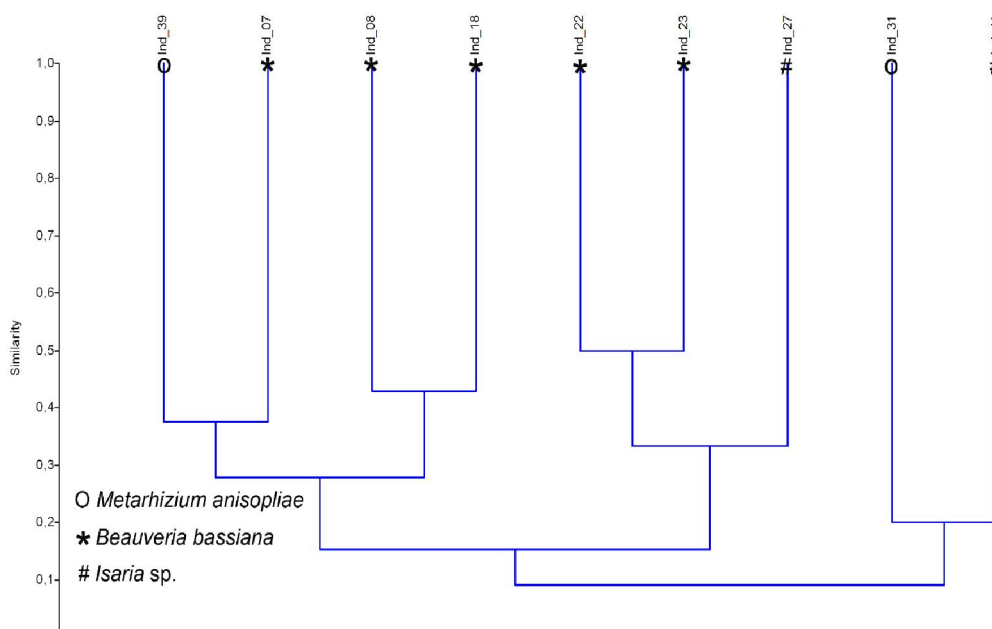


Figura 8 – Porcentagem de similaridades existente entre os nove indivíduos de fungos entomopatogênicos estudados (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria* sp.), gerado a partir do programa estatístico Past ver. 2.17c pelo índice de Jaccard.

Fonte: A autora (2015).

WANG et al., (2005), indicam que os marcadores ISSR encontraram um alto nível de polimorfismo a nível de DNA. Em indivíduos de *B. bassiana*, utilizou-se a técnica de PCR, onde foi possível realizar a amplificação do DNA da espécie.

AQUINO et al. (2005) verificaram que PCR-ISSR é uma boa técnica para revelar polimorfismos. Em seus estudos, com os três primers juntos houve 44 bandas polimórficas para os indivíduos de *B. bassiana*, sendo aproximadamente 14 bandas polimórficas para cada primer utilizado.

O grau de similaridade mais alto entre os indivíduos foi de 50%, sendo entre os indivíduos de *B. bassiana* 22 e 23, no qual o indivíduo 27 também possui um grau de parentesco com os mesmos, o que não deveria acontecer pois o isolado 27 foi identificado morfológicamente como sendo da espécie *M. anisopliae*. Este fato pode ter ocorrido devido ao pequeno número de isolados de cada espécie, o que torna a análise estatística menos confiável.

A similaridade entre os isolados 08 e 18 chega a 42,85%, os dois são representantes da espécie *B. bassiana*. Entre os indivíduos 07 e 39 também houve uma porcentagem alta de similaridade chegando a 37,5%, mas estes representam espécies diferentes. Sendo o isolado 07 *B. bassiana* e o isolado 39 *M. anisopliae*. Do mesmo modo houve similaridade de 20% entre os indivíduos 31 e 41, os quais também não pertencem a mesma espécie, sendo *M. anisopliae* e *Isaria* sp. respectivamente.

Devido a ocorrência de similaridade entre indivíduos de espécies diferentes, podemos destacar que houve poucos indivíduos amostrais, o que pode ter induzido ao erro. Também o fato de somente um dos *primers* utilizados ter trazido resultados positivos, ou seja, com os dados de apenas um dos *primers* é difícil a realização de uma estatística confiável. Para existir uma boa comparação entre os isolados, seria necessário um maior número de amostras, para então realizar a similaridade entre indivíduos.

A tentativa de caracterização molecular dos isolados através da amplificação PCR-ITS, utilizando o *primer* forward ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e do iniciador reverse ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') Invitrogen®, foi negativa. Os primers utilizados não originaram amplificação do DNA. Quando realizada a prática de eletroforese para confirmação da técnica (PCR-ITS), não foi possível realizar a observação das bandas de DNA, como mostra a Figura 9.

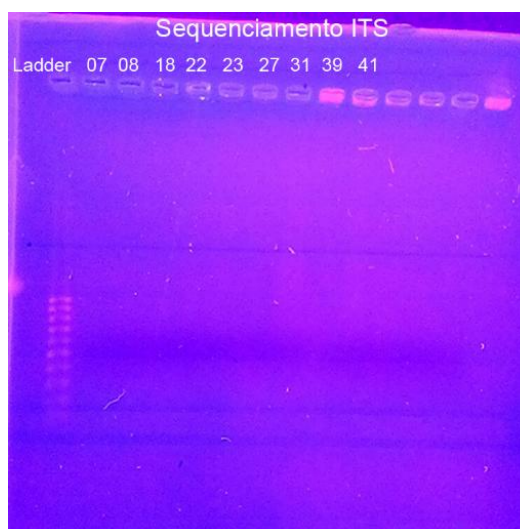


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação negativa do DNA de cada um dos isolados, de fungos entomopatogênicos, com a técnica de PCR-ITS. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas, *Beauveria bassiana* representada pela numeração 07, 08, 18, 22 e 23. *Metarhizium anisopliae* pelos números 31 e 39, e *Isaria* sp. 27 e 41.

Fonte: A autora (2015).

Da mesma forma como na técnica de PCR-ISSR, os DNAs são dispostos para a corrida e são separados pelo seu peso molecular. Para se obter estimativa da quantidade de nucleotídeos destes foi colocado o Ladder como gabarito, para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra. Como observado na Figura 9, não houve formação de bandas no gel, pois o DNA não foi amplificado pelos *primers* utilizados. Estes *primers* não conseguiram realizar a amplificação das fitas do DNA dos fungos entomopatogênicos, sendo assim a realização de outros testes para que se possa definir uma padronização do protocolo utilizado possa ser necessária.

Novos estudos com mais indivíduos amostrais devem ser realizados, para que assim, se possa obter um bom resultado de similaridade entre isolados. Além disso, recomenda-se também a busca por outros *primers* de ISSR e a tentativa pelas adaptações das condições ideais de amplificação para o sequenciamento por ITS.

Foi possível a realização da identificação morfológica dos fungos encontrados nas amostras de solo, e também a análise microscópica dos mesmos. Já com a biologia molecular foi plausível somente para um dos *primers* utilizados, sendo este o CCA. Futuros estudos podem ser realizados para que se possa conseguir adaptar protocolos e *primers* para a amplificação do DNA de fungos entomopatogênicos. Com

a identificação morfológica e molecular dos fungos entomopatogênicos, podemos trabalhar com mais facilidade com os mesmos, pois assim podemos ter controle de insetos pragas que atacam a cultura de eucalipto dentro do próprio povoamento, não sendo necessário o agricultor utilizar inseticidas.

5 CONCLUSÃO

Os fungos entomopatogênicos encontrados em solo com plantio de eucalipto, foram *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria* sp. confirmando diversidade de espécies entomopatogênicas em solos com plantio de eucalipto.

A caracterização molecular dos indivíduos pode ser confirmada por apenas um dos primers utilizados (CCA), onde pode-se observar similaridade entre indivíduos de espécies diferentes.

REFERÊNCIAS

ABRAF. Anuário estatístico ABRAF 2013 ano base 2012 / ABRAF. Brasília 2013. Disponível em: < <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/3887> >. Acesso em: 29 set. 2014.

ALVES, Sergio, B. Fungos entomopatogênicos In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-381.

ALVES, Sergio, B.; MEDEIROS, Marcos, B. de.; TAMAI, Marco, A.; LOPES, Rogério, B. Trofobiase e Microrganismos na proteção de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 21, p.16-21, jul./ago. 2001.

ALVES, Luis, F. A.; ALVES, Viviane, S.; BRESSAN, Dayanne, F.; NEVES, Pedro, M. O. J.; ALVES, Sergio, B. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em Adultos de Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em Aviários Comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**. Londrina, v. 33, n. 6, Nov./Dec. 2004.

ALVES, Sérgio, B. et al. **Controle microbiano de pragas na América latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008.

ALVES, Roberto, T.; FARIA, Marcos. **Pequeno Manual sobre Fungos Entomopatogênicos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010.

AQUINO, Marilena, M.; ELLIOTT, Sarah,; MOORE, David; PARKER, Bruce, L.; SKINNER, Margaret; REID, William; BOUHSSINI, Mustapha. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). **Mycological Research**. v.109, p. 294–306, mar. 2005.

AZEVEDO, João, L. de; ARAÚJO, Welington, L. de; INÁCIO, Carlos, A. **Taxonomia: Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus**. Disponível em:< www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752>. Acesso em: 09 out. 2014.

AZEVEDO, João, L. O uso dos fungos em biotecnologia, p.93-149. In: SEREFINE, Luciana. A., BARROS, Neiva, M. AZEVEDO, João, L.. **Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, p. 433, 2001.

BARBOSA, Renan, do N; JÚNIOR, Nelson, C. de L.; BEZERRA, Jadson, D. P.; GALVÃO, Ivana, R. G. A. de S.; SANTOS, Anthony. A. J.; MOTTA, Cristina, M. de S.; OLIVEIRA, Neiva, T. de. **Utilização da região its na identificação de aspergillus isolados em solos de caatinga.** Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R1227-1.pdf>>. Acesso em: 23 Abri. 2015.

BUSETTI, Aline; VARGAS, Lucia, R. B.; SPECHT, Alexandre; BARROS, Neiva, M. de. **Isolamento de fungos entomopatogênicos em solo de videira cultivada sob manejo orgânico e convencional.** In: XVIII Encontro de Jovens Pesquisadores, 2010, Caxias do Sul.

CARNEIRO, Andréa, A.; GOMES, Eliane, A.; NONATO, Luciane, F. V.; BRITTO, Wellerson, M. A.; FERNADES, Fernando, T.; CARNEIRO, Newton, P.; GUIMARÃES, Claudia, T.; CRUZ, Ivan. Caracterização Molecular de Fungos Entomopatogênicos Utilizados no Controle Biológico de Pragas do Milho – *Beauveria bassiana* versus *Spodoptera frugiperda*. **Comunicado técnico 93.** Sete Lagoas, 2004. Disponível em: <<http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/milho/Comunicado93.pdf>>. Acesso em: 07 out. 2014.

CARNEIRO, Andréa, A.; GOMES, Eliane, A.; GUIMARÃES, Claudia, T.; FERNANDES, Fernando, T.; CARNEIRO, Newton, P.; CRUZ, Ivan. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** Brasília, v. 43, n.4, p. 513-520, abr. 2008.

DALLACORT, Sidinej; POTRICH, Michele; SILVA, Everton, R. L.; LORENCETTI, Grasielle, A. T.; PURETZ, Barbara. **Isolamento de fungos entomopatogênicos do solo em sistemas de produção convencional e orgânico.** In: Siconbiol, 13, Bonito, 2013.

DAL POGETTO, MÁRIO, H. F. DO A. **Avaliação de produtos comerciais de fungos entomopatogênicos no controle do psilídeo-deconcha *Glycaspis brimblecombei* (hemiptera: psyllidae).** 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

DOLINSKY, Luciana, C. de B. As Diversas Aplicações da Genética Molecular no século XXI: uma Nova era nas Ciências Biológicas- artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em revista.** Duque de Caxias, v.2, n.1, p.21-25, jan./jun. 2007.

DOSSA, Derli; SILVA, Helton, D.; BELLOTE, Antonio, F. J.; RODIGHIERI, Honorino, R. Produção e Rentabilidade do Eucaliptos em Empresas Florestais. **Comunicado Técnico 83.** Colombo, 2002. Disponível em:

<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/comuntec/edicoes/com_tec83.pdf>. Acesso em: 29 set. 2014.

EMBRAPA. **Controle biológico**. 2006. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355163/1994475/fold06-08_controleBiologico.pdf/71cf43ce-0f8e-46da-ac5a-4c76688170e5>. Acesso em: 10 mai. 2015.

EMBRAPA. **O controle biológico na área florestal**. 2010. Disponível em:<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto_2ed/Pragas_Controlo.htm>. Acesso em: 29 set.2013.

FARIA, Marcos, R., de. MAGALHÃES, Bonifácio, P. O uso de Fungos Entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 4, p. 18-21, set./out. 2001.

FLORESTAR - Associação Paulista de Produtores de Florestas Plantadas, s/p, 2006. Disponível em:<<http://www.floresta.org.br/index.php?interna=textos/eucalipto&grupo=4>>. Acesso em: 29 set. 2014.

FERBASA. Disponível em: <http://www.mzweb.com.br/ferbasa2011/web/conteudo_pt.asp?idioma=0&tipo=34266&conta=28>. Acesso em: 29 set. 2014.

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

HOLTZ, Anderson, M.; POLANCZYK, Ricardo, A.; ZANUNCIO, José, S.J.; PRATISSOLI, Dirceu.; FERREIRA, Renata, A.; DALVI, Leandro, P.; BORTOLINI Franciene, de C. Interferência do fungo entomopatogênico *beauveria bassiana* (vuil.) No desenvolvimento do predador *podisus nigrispinus* em laboratório. **Scientia Agraria**. Curitiba, v.10, n.6, p.483-488, Nov./Dec. 2009.

IPEF – Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. **Ocorrência do Psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) (Hemiptera: Psyllidae) em florestas de eucalipto no Brasil**. 2003. Disponível em: <<http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/bitstream/handle/123456789/3823/ipef-circular-tecnica-2003-dezembro-n-201.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 29 set. 2014.

LAZO, María, L. S. R. **Caracterização e patogenicidade de fungos entomopatogênicos isolados do percevejo-bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-proteção de plantas)- Faculdade de Ciências Agronômicas - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

LORENCETTI, Grasielle, A. T. **Potencial de fungos entomopatogênicos e produtos alternativos para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* carpintero & dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) e indução de resistência em plantas**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em agronomia)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

MELO, Itamar, S., de.; AZEVEDO, João, L., de; **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA meio ambiente, 2000.

MOREIRA, Alberto, C. **Manejo integrado de pragas florestais: fundamentos ecológicos, conceitos e táticas de controle**. 1. ed. Rio de Janeiro. 2014.

PINHO, Mauro, de. S. L. Pesquisa em Biologia Molecular: como fazer? **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 26, n.3, jul./set. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbc/v26n3/a16v26n3.pdf>>. Acesso em: 08 out. 2014.

PRAGAS FLORESTAIS- remade- **Revista da Madeira**. n.104. abr. 2007. Disponível em:<http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1079&subject=Pragas#>. Acesso em: 08 out. 2014.

QUEIROZ, Dalva, L. de; BARBOSA, Leonardo, R; **Árvore do conhecimento eucalipto - pragas**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/eucalipto/arvore/CONTAG01_57_1912200211917.html#>. Acesso em: 04 out. 2014.

RODRIGUES, A. M; LOUREIRO, E. S. Confecção de uma coleção de fungos entomopatogênicos com isolados encontrados em culturas agrícolas e ambientes de preservação ambiental em mato grosso do sul. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.76, n.2, p.303-306, abr./jun., 2009.

SANTANA, Dalva, L. de Q.; MENEZES, Ayres, J.; SILVA, Helton, D. da; BELLOTE, Antônio, F. J.; FAVARO, Rodolfo, M. **O Psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) em Eucalipto**. 2003. Disponível em:<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

SOLIMAN, Everton P. **Controle biológico de *thaumastocoris peregrinus* (hemiptera: thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos**. 2014. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

SOUZA, Giselle, A. de; CARVALHO, Márcia, R. de O.; MARTINS, Ernane, R.; GUEDES, Raul, N. C.; Oliveira, Luiz, O. de; Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.43, n.7, p.843-849, jul. 2008.

WANG, Sibao; MIAO, Xuexia; ZHAO, Weiguo; HUANG, Bo; FAN, Meizhen; LI, Zengzhi; HUANG, Yongping. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **Mycological Research**. p. 1364–1372, dec. 2005.

WEILER, Roberto, L.; TEIXEIRA, Fernanda, S.; KANEKO, Lécio.; WEILER, Celso, A; Ocorrência do fungo entomopatogênico *Lecanicillium longisporum* Zimmerman em *Orthezia praelonga* Douglas (Hemiptera: Ortheziidae). **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.32, n.1, p.53-58, 2011.

WILCKEN, Carlos, F.; FILHO, Evoneo, B. **Vespa-Da-Galha do Eucalipto (*Leptocybe invasa*) (Hymenoptera: Eulophidae): Nova Praga de Florestas de Eucalipto no Brasil**. Disponível em: < <http://www.ipef.br/protECAo/alerta-leptocybe.invasa.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification**. **Genomics** 20: p.176–183, 1994.