

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**FERNANDA SUELLEN TELES PEREIRA**

**OCORRÊNCIA DE *METARHIZIUM* NA RIZOSFERA DE PLANTAS  
EM CULTIVO DE CAFÉ AGROFLORESTAL**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**BRASIL**

**JULHO – 2017**

FERNANDA SUELLEN TELES PEREIRA

OCORRÊNCIA DE *METARHIZIUM* NA RIZOSFERA DE PLANTAS  
EM CULTIVO DE CAFÉ AGROFLORESTAL

Trabalho apresentado à disciplina FIT499  
- Trabalho de conclusão de curso da  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências para obtenção do  
título de Bacharel em Engenharia  
Agrônômica.

Orientador: Prof. Simon Luke Elliot

Coorientadores: Camila Costa Moreira

Filipe Constantino Borel

VIÇOSA – MINAS GERAIS

BRASIL

JULHO – 2017

**OCORRÊNCIA DE *METARHIZIUM* NA RIZOSFERA DE PLANTAS EM  
CULTIVO DE CAFÉ AGROFLORESTAL**

FERNANDA SUELLEN TELES PEREIRA

[fstelespereira@gmail.com](mailto:fstelespereira@gmail.com)

Trabalho apresentado à disciplina FIT499- Trabalho de conclusão de curso da  
Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para obtenção do título de  
Engenheiro Agrônomo.

Aprovado em: 12/06/2017

Banca Examinadora:

---

Prof.: Jose Antônio Saraiva Grossi (UFV)

---

Prof.: Simon Luke Elliot (Orientador) (UFV)

---

Doutora: Camila Costa Moreira (Co-orientador) (UFV)

---

Estudante de Doutorado: Filipe Constantino Borel (Co-orientador) (UFV)

---

Estudante de Doutorado: Samuel de Melo Goulart (Membro integrante da banca  
examinadora) (UFV)

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar forças nos momentos de dificuldades e por sempre guiar e iluminar os meus caminhos, dando-me sabedoria e serenidade quando necessário.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de conhecimento e amadurecimento, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de iniciação científica.

Aos agricultores do município de Araponga-MG por permitirem o uso de suas propriedades para pesquisa.

Ao meu orientador Simon Luke Elliot, pela orientação, confiança e oportunidade de fazer parte de sua equipe.

Agradeço a minha co-orientadora Camila Moreira que me acompanhou e se dedicou ao meu crescimento acadêmico, que me ouviu e me aconselhou. Quando eu tive dúvidas você foi minha inspiração. Obrigada por confiar em meu trabalho, pelo carinho e paciência.

Ao doutorando Filipe Borel pela participação na defesa do TCC e pelos ensinamentos no Laboratório Unidade de Controle Biológico. Obrigada pelos conselhos, pela atenção e dedicação.

À equipe do Laboratório de Interações Inseto-Microrganismo pelo companheirismo, apoio e contribuição ao meu crescimento profissional. Foi muito bom fazer parte desse grupo. Obrigada pela amizade e companheirismo dentro e fora do ambiente de trabalho. Débora, Mayara, Marcela, Marcos, Thayrine, Daniel, Farley e Silma, obrigada por todo sorriso e apoio.

Agradeço aos meus pais, Fernando e Edivânia e ao meu irmão Carlos. Sem o apoio de vocês seria impossível chegar até aqui. Obrigada por todo amor, carinho, confiança e dedicação. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus amigos de Viçosa, parte fundamental na minha formação, com os quais aprendi e amadureci muito nesses cinco anos e meio. Em especial agradeço a República CasAmiga, vocês foram minha família, Thamiris, Thaline e Lurian, obrigada por todos os momentos que tivemos juntas. Aos amigos, Gustavo, Michel, Renato, Bernardo, Lorena, Fernanda, Camila, Nathalia por terem acreditado sempre em mim muito mais do que eu mesma.

Por fim, mas não menos importante, ao Diego pela paciência, carinho, apoio e companheirismo.

A todos que se fizeram presentes nessa caminhada de alguma forma, o meu muito obrigado!

## Sumário

RESUMO .....	vi
1. Introdução.....	7
2. Materiais e Métodos .....	9
2.1. Área de Estudo.....	9
2.2. Amostragem de raízes.....	9
2.3. Contagem de UFC e Isolamento de <i>Metarhizium</i> .....	10
2.4. Análise estatística da contagem de UFC.....	10
2.5. Extração de DNA e análise de PCR.....	11
2.6. Identificação dos isolados de <i>Metarhizium</i> através de Basic Local Alignment Search Tool - BLAST .....	12
3. Resultados .....	13
3.1. Contagem de UFC Total .....	13
3.2. Número de amostras positivas e Contagem de UFC para <i>Metarhizium</i> .....	14
3.3. Identificação dos isolados de <i>Metharizium</i> .....	16
4. Discussão.....	18
5. Conclusão .....	20
6. Referências .....	21

## RESUMO

PEREIRA, Fernanda Suellen Teles, Monografia., Universidade Federal de Viçosa, junho 2017. **Ocorrência de *Metarhizium* na rizosfera de plantas em cultivo de café agroflorestal.** Orientador: Simon Luke Elliot. Coorientadores: Camila Costa Moreira; Filipe Constantino Borel.

Compreender a abundância e diversidade de inimigos naturais de pragas, principalmente em sistemas agrícolas é importante para explorar suas funções ecológicas dentro desse ecossistema. Fungos do gênero *Metarhizium*, são cosmopolitas e amplamente conhecidos por sua capacidade entomopatogênica. Apesar de sua ocorrência em solos dos mais diferentes ecossistemas, sua diversidade e abundância têm sido associada ao sistema de cultivo. No presente estudo tivemos como objetivo determinar a ocorrência e abundância de espécies de *Metarhizium* presente na rizosfera de plantas em cultivo de café Agroflorestal. O experimento foi conduzido no município de Araponga - Minas Gerais (20° 48' S e 42° 32' O). *Metarhizium* foi isolado em meio seletivo contendo concentrações diferentes do agente seletivo CTAB (0.35 e 0.175 g L<sup>-1</sup>), a partir de amostras de raiz de plantas de café, árvores, banana, monocotiledôneas e dicotiledôneas espontâneas. Todo o material genético extraído foi enviado para sequenciamento e posterior análise. Foi realizada análise via BLAST para determinar quais as espécies de isolados estavam presentes em cada tipo de planta hospedeira. Foram isoladas quatro espécies de *Metarhizium*: *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. brunneum* e *M. pemphigi*. *Metarhizium robertsii* foi a espécie mais frequente e única presente em todos os grupos de plantas. Essa espécie é extremamente versátil, sendo encontrada colonizando a rizosfera de plantas, como saprófita e simbiote de plantas. *M. pemphigi* foi a segunda espécie mais frequente, sendo encontrado em grande abundância em café e em baixa frequência em árvores e monocotiledôneas, o que pode indicar uma preferência pelo microambiente gerado pela rizosfera dessa cultura. Nesse sentido, pesquisas futuras devem ser feitas para compreender melhor as interações dessa espécie de *Metarhizium* com café. *M. anisopliae* foi isolada em baixas frequências em banana e monocotiledôneas. Foi encontrado um único isolado de *M. brunneum*. Essa espécie de *Metarhizium* foi isolada pela primeira vez em ambiente tropical, o que indica que pesquisas futuras precisam ser feitas no sentido de entender melhor a distribuição e ecologia dessa espécie.

## 1. Introdução

A intensificação da agricultura tem sido bem sucedida ao atender a crescente demanda mundial por alimentos (BOMMARCO *et al.*, 2013). Por outro lado, este modelo de produção intensiva tem gerado muitos impactos negativos ao ambiente e à biodiversidade (BOMMARCO *et al.*, 2013), portanto, um dos grandes desafios da atualidade é conciliar a crescente demanda por alimentos às formas de produção mais sustentáveis (TILMAN *et al.*, 2002; T. GARNETT *et al.*, 2013).

Segundo Tschardtke e colaboradores (2005), os sistemas agrícolas quando bem manejados, possuem a capacidade de aumentar a biodiversidade e os serviços de ecossistemas. Um exemplo desse tipo de sistema agrícola seriam os Sistemas Agroflorestais (SAF's). Estes são caracterizados por promoverem maior sustentabilidade ecológica, pois combina o manejo do solo com espécies arbóreas e herbáceas associados a cultivos agrícolas e/ou criação de animais em uma mesma área, de maneira simultânea ou sequencial (GAMA, 2003). Esses sistemas se apoiam no princípio da diversidade biológica, que visa o emprego de maior número de espécies de plantas por área, além disso, possuem a capacidade de reduzir o uso de insumos agrícolas, melhorando o uso e conservação das características do solo e água. Assim, os SAF's contribuem para a manutenção da biodiversidade local e promovem também a sustentabilidade econômica (VALERI *et al.*, 2003). Associado à diversidade biológica, estão os serviços de ecossistemas, que são bens e serviços obtidos pelo homem, de forma direta ou indireta a partir dos processos naturais dos ecossistemas (OLIVEIRA, 2003). Um exemplo importante desse tipo de serviço seria o controle das populações de insetos praga em um sistema agrícola promovido por inimigos naturais (LOSEY & VAUGHAN, 2006).

Fungos entomopatogênicos são importantes promotores de serviços de ecossistemas, uma vez que possuem a capacidade de controlar as populações de insetos praga em um sistema agrícola de forma natural (HAJEK & LEGER, 1994). Além disso, têm se destacado como alternativa ao uso intensivo de pesticidas, como agentes de controle biológico (MEYLING *et al.*, 2007, HAJEK & LEGER, 1994). A maioria dos produtos comerciais biológicos são à base de fungos do gênero *Metarhizium*, *Beauveria*,

*Lecanicillium* e *Isaria*, por atenderem aos requisitos de produção; como custo razoável, estabilidade em longo prazo e eficácia em condições de campo, além de relativa facilidade de produção em massa (VEGA *et al.*, 2009).

Dentre os fungos entomopatogênicos mais citados e estudados encontram-se as espécies do gênero *Metarhizium* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae) (SUNG *et al.*, 2007). Espécies de *Metarhizium* são cosmopolitas, podendo ser encontrados em diversos tipos de ambientes e controlando uma ampla gama de artrópodes e aracnídeos (ROBERTS & ST. LEGER, 2004), incluindo vetores de doenças humanas (RODRIGUES *et al.*, 2015; LACEY *et al.*, 1988; SANTOS *et al.*, 2009). Também são encontrados em associação mutualística com raízes de plantas, como colonizadores da rizosfera (HU & ST. LEGER, 2002; BRUCK, 2005) ou endofíticos (BEHIE *et al.*, 2012) em associação simbiótica, transferindo nitrogênio de insetos mortos para a planta (BEHIE *et al.*, 2012; BEHIE; BIDOCHKA, 2014).

O gênero consiste em um grupo diverso de fungos que apresentam duas fases: anamórfica (assexual) e telemórfica (sexual) (SUNG *et al.*, 2007). É um fungo filamentoso, apresenta micélio hialino marrom ou verde e septado, em sua mais recente revisão taxonômica inclui 30 espécies (KEPLER *et al.*, 2014). Na fase anamórfica podem ser encontrados causando doenças em um amplo espectro de hospedeiros (ALVES, 1998). O processo de infecção é semelhante ao de outros fungos entomopatogênicos, incluindo o processo de reconhecimento e adesão do conídio na cutícula do hospedeiro, penetração por meio de processos físicos e enzimáticos, colonização e comprometimento do sistema de defesa do hospedeiro, reprodução e finalmente novas estruturas fúngicas, os conídios, que emergem do corpo do hospedeiro (BIDOCHKA; SMALL, 2005).

As espécies pertencentes ao complexo *Metarhizium anisopliae* (BISHOFF *et al.*, 2009) são as mais comuns em solos de todo o mundo e tem sido usadas como agentes de controle biológico contra várias espécies de insetos (SHAH & PELL 2003). No Brasil, *M. anisopliae* tem sido usado com sucesso em produtos comerciais para o controle do complexo de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae), incluindo *M. fimbriolata* e *M. posticata* em cana-de-açúcar e *M. fimbriolata*, *D. flavopicta* e *N. entreriana* em pastagem (ALVES *et al.*, 2008).



Algumas pesquisas sugerem que espécies de *Metarhizium* possuem associações específicas com a rizosfera das plantas (FISHER *et al.*, 2011; WYREBEK *et al.*, 2011), por outro lado, Steinweder e colaboradores (2015) não encontraram especificidade desse gênero de fungos à rizosfera das plantas. Estudos recentes têm demonstrado que a diversidade de *Metarhizium* é maior em ambientes com grande número de espécies vegetais quando comparado à diversidade de cultivos convencionais (MOREIRA submetido). Acreditamos que cultivos com maiores diversidades de plantas podem influenciar na abundância de espécies de *Metarhizium* devido à especificidade do fungo à rizosfera de determinados hospedeiros. Portanto, nesse trabalho focamos em compreender a ocorrência de *Metarhizium* associados à rizosfera de plantas em cultivo de café agroflorestal.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Área de Estudo**

O estudo foi conduzido em uma propriedade no município de Araponga (20° 48' S e 42° 32' O), pertencente à mesorregião Zona da Mata Mineira e inserida no bioma da Mata Atlântica. O clima da região é tropical de altitude e as médias de temperatura e precipitação estão em torno de 18°C e 1.500mm com 2 a 4 meses secos por ano. A principal produção da propriedade é café sob o sistema orgânico agroflorestal. A propriedade foi escolhida devido à grande diversidade de árvores e plantas espontâneas associadas ao cultivo do café. Além disso, a área também apresenta um fragmento de floresta adjacente à cultura.

### **2.2. Amostragem de raízes**

Foram amostradas, aleatoriamente, raízes de todos os tipos de plantas presentes na área, sendo estas: café (CF), banana (BN), árvores (AR), dicotiledôneas (DC) e monocotiledôneas (MN) espontâneas. De cada tipo de planta foram coletadas 30

amostras de raízes, totalizando 150 amostras. As amostras de raízes foram imediatamente etiquetadas e armazenadas em sacos plásticos individuais.

### **2.3. Contagem de UFC e Isolamento de *Metarhizium***

Em laboratório, foram pesadas 0.5 g de raízes de cada amostra coletada. Estas foram maceradas individualmente com ajuda de cadinhos e pistilos estéreis em câmara de fluxo. Às raízes maceradas foram acrescidas 20 mL de solução de Tween 80 a 0.01% estéril em tubos de 50 ml. Os tubos foram rotacionados em shaker a 150rpm por 1 hora. Após essa etapa, duas alíquotas de 100 µl da suspensão resultante foram plaqueadas em meio seletivo. Cada alíquota de 100 µl foi plaqueada em uma placa de Petri contendo uma concentração diferente do agente seletivo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). O meio consistiu de 10 g de peptona L<sup>-1</sup>, 20 g de dextrose L<sup>-1</sup>, 0.6 g estreptomicina L<sup>-1</sup>, 0.05 g ciclohexamida L<sup>-1</sup>, 0.05 g tetraciclina L<sup>-1</sup> e duas concentrações de CTAB: 0.35 e 0.175 g CTAB L<sup>-1</sup>, nomeadas aqui como concentração “alta” e “baixa” respectivamente. As placas foram incubadas em BOD a 26°C por 20 dias. Após esse prazo, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) total, onde os fungos *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Isaria* spp. e *Pochonia chlamidospora* foram avaliados e registrados de acordo com a espécie de planta a qual a amostra pertencia. Foram identificadas também as placas positivas para *Metarhizium*, através da observação de morfologia de colônias e foi realizada novamente a contagem de UFC apenas para *Metarhizium*. Das amostras positivas, uma colônia proveniente de cada placa foi reisolada em placa de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g de Batata L<sup>-1</sup>, 20 g de Dextrose L<sup>-1</sup> e 15 g de Agar L<sup>-1</sup>). Nas placas em que foram encontradas colônias de *Metarhizium* apresentando diferentes morfologias, as colônias foram reisoladas em placas separadas.

### **2.4. Análise estatística da contagem de UFC**

Todas as análises foram feitas no software R versão 3.2.0 (R Development Core Team 2015). A contagem total de UFC de fungos entomopatogênicos e de *Metarhizium* por categoria de planta hospedeira foram analisados utilizando modelos lineares

generalizados (GLM). As variáveis dependentes seguiram o modelo de distribuição quasi-poisson. Foram realizadas análises de variância ANOVA e para detectar as diferenças utilizou-se o teste Qui-quadrado (Crawley 2007). O número médio de colônias por categoria de planta hospedeira foi comparada através de múltiplos contrastes usando a função 'glht' implementada no pacote R MULTCOMP. A análise de sobredispersão de dados e as análises residuais também foram realizadas para determinar a aceitabilidade do modelo e a distribuição de erros.

O número de amostras positivas para *Metarhizium* por categoria de planta hospedeira também foi analisado utilizando GLM. O número de amostras positivas de *Metarhizium* constituiu a variável resposta e o tipo de planta hospedeira, a variável explicativa. A variável resposta foi uma distribuição binomial e analisada por ANOVA com testes  $\chi^2$ . Neste caso, a análise de sobredispersão de dados e as análises residuais também foram realizadas para determinar a aceitabilidade do modelo e a distribuição de erros. A porcentagem de amostras positivas para *Metarhizium* provenientes de cada planta hospedeira foi analisada através de múltiplos contrastes usando a função 'glht' implementada no pacote R MULTCOMP.

## 2.5. Extração de DNA e análise de PCR

Após a confirmação de que as placas contendo os isolados de *Metarhizium* não estavam contaminadas, foram feitas culturas monospóricas. Para isso, uma pequena quantidade de esporos foi suspensa em 1 mL de solução de Tween 80 0.01% estéril. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão foi plaqueada em placas de Petri contendo BDA e incubadas por 12 h à 26°C. Após esse período, um único conídio germinado de cada placa foi transferido para uma nova placa contendo BDA e incubados em BOD por aproximadamente 10 dias. Os isolados foram cultivados em meio líquido (40 g de Peptona L<sup>-1</sup>, 40 g de Extrato de levedura L<sup>-1</sup>e 10 g Dextrose L<sup>-1</sup>) a 26°C em BOD por 7 dias. O micélio obtido foi seco em papel filtro previamente esterilizado e macerado mecanicamente com esferas de aço em um macerador Tissuelyser (QIAGEN Ltda.). O DNA genômico foi extraído com o kit de extração de DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, WI, U.S.A.) seguindo o protocolo de extração. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose, a partir da visualização de banda, preparado em tampão 1x Tris-borato-EDTA (TBE), e corado com GelRed™

(Biotium Inc.). A concentração do DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e ajustada a 25 ng/μL.

Os iniciadores utilizados para amplificação foram EF1T (5'ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF2T (5'GGAAGTACCAGTGATCATGTT) que aplicam a porção final da região genômica fator de alongamento e tradução 1  $\alpha$  (5'TEF) (BISCHOFF *et al.*, 2009). Estes foram usados para replicar a região mencionada acima nos 118 isolados de *Metarhizium* obtidos. O volume total da reação de PCR foi de 25 μL, sendo 12.5 μL Dream Taq™ PCR Master Mix, 1 μL de cada iniciador no sentido direto e reverso na concentração de 10 μM (Sigma- Aldrich), 1 μL Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), 2,5 μL Albumina Bovina (BSA, Sigma-Aldrich), 2 μL de DNA genômico e 5 μL de água ultra pura para completar o volume da reação. As condições de ciclagem da reação foram 2 min a 94°C para desnaturação inicial seguido de 40 ciclos de 30 s desnaturação a 94°C, 30 s anelamento a 56°C, 45 s extensão a 72°C concluindo com 10min de incubação a 72°C. Em seguida foi verificada a qualidade da reação através de fluorescência ultravioleta em géis de agarose de eletroforese corados com GelRed™ (Biotium Inc.). O gel foi preparado a 1% de agarose numa razão de 1x tampão Tris-borato-EDTA (TBE). O produto da reação foi purificado e sequenciado pela Macrogen Inc.

## **2.6. Identificação dos isolados de *Metarhizium* através de Basic Local Alignment Search Tool - BLAST**

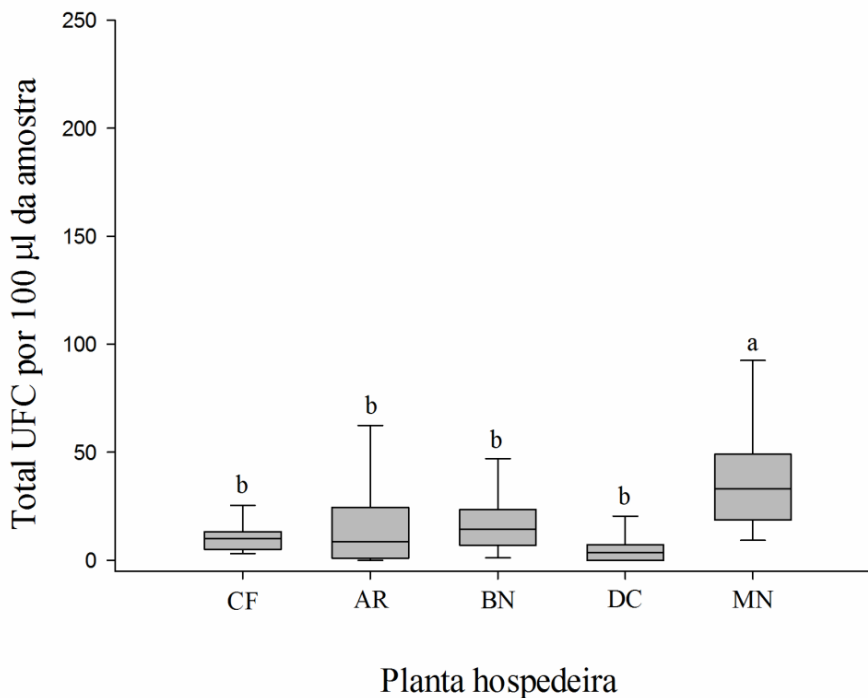
Para identificação preliminar dos isolados, as sequências obtidas foram editadas com auxílio do programa DNA Dragon (Hepperle 2010) e foi usada a ferramenta BLAST para comparar as sequências obtidas no experimento com o banco de dados mundial disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI) através do link: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. No BLAST foi selecionada a opção de análise de sequências de nucleotídeos, o parâmetro utilizado foi o *Megablast*. Em trabalho posterior foi feita análise filogenética para determinar com precisão as espécies de *Metarhizium* isoladas.

### 3. Resultados

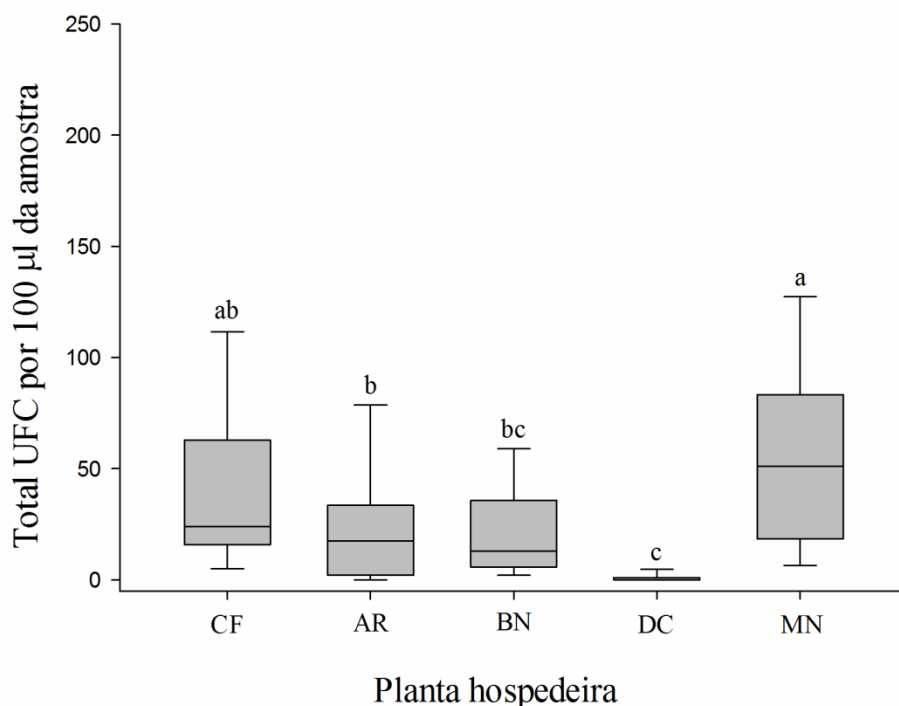
#### 3.1. Contagem de UFC Total

Foi observado um efeito negativo do aumento da concentração de CTAB no número total de Unidades Formadoras de Colônias ( $\chi^2$  [298]= 9858.5,  $P<0.001$ ). O meio com alta concentração do reagente apresentou 59.3% menos colônias do que o meio com baixa concentração de CTAB. No meio com alta concentração de CTAB, o grupo de plantas que apresentou maiores contagens de UFC foram as Monocotiledôneas (Fig. 1A), apresentando resultado estatisticamente diferente das demais plantas. Para os demais grupos de plantas não houve diferença significativa (Fig. 1A). Para as amostras plaqueadas no meio com baixa concentração de CTAB (Fig. 1B), as plantas que obtiveram maiores contagens de UFC foram Café (CF) e Monocotiledôneas (MN), não apresentando diferença entre elas ( $P=0.29$ ). Dicotiledôneas (DC) foi o grupo de plantas que teve a menor contagem de UFC. Foram isoladas colônias de *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Isaria* spp. e *Pochonia chlamidospora*.

CTAB Alta concentração



### CTAB Baixa concentração



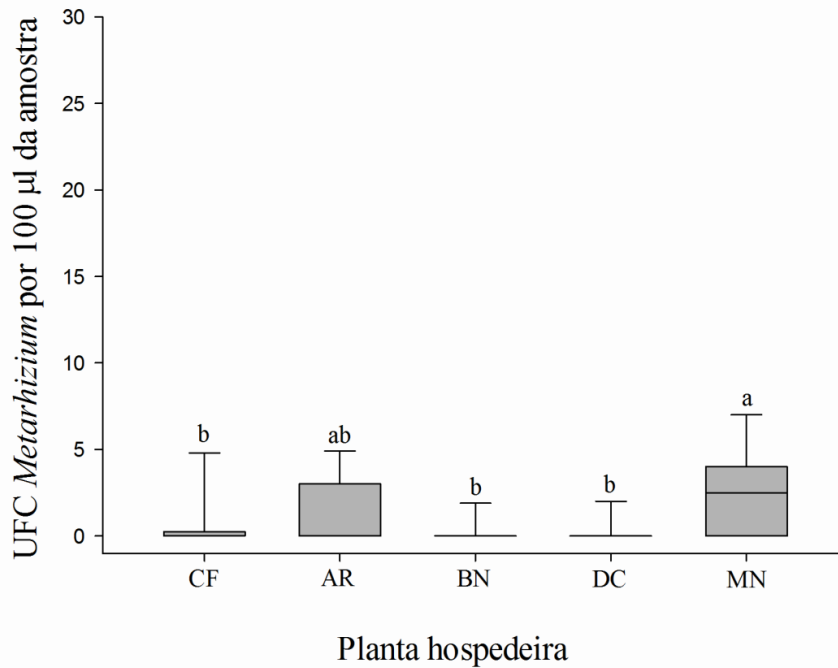
**Figura 1.** Contagem total de UFC para diferentes grupos de plantas, onde: CF=Café, AR=Árvore, BN=Banana, DC=Dicotiledôneas, MN=Monocotiledôneas. A figura CTAB alta concentração indica  $0.35\text{g L}^{-1}$  e a figura CTAB baixa concentração indica  $0.175\text{g L}^{-1}$ . O nível de significância está representado pelas letras acima das hastes à  $P < 0.05$ .

### 3.2. Número de amostras positivas e Contagem de UFC para *Metarhizium*

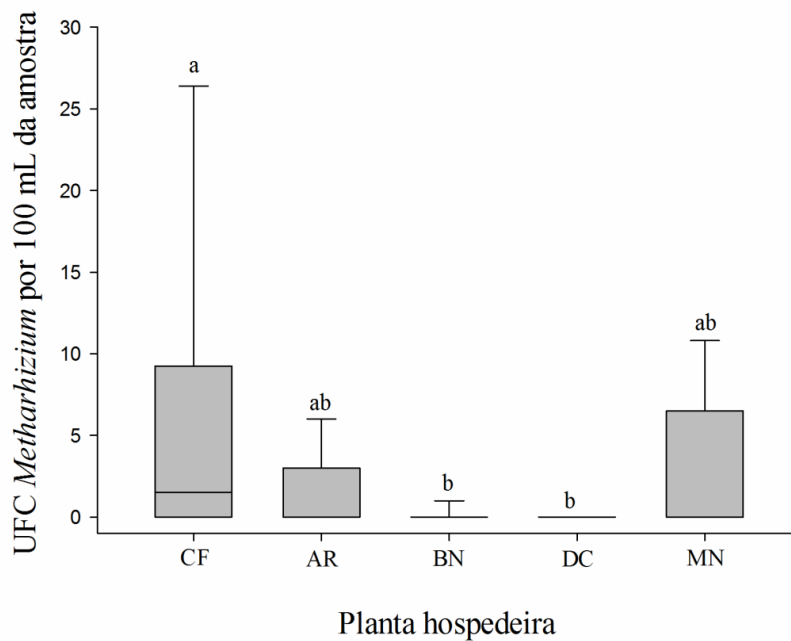
Neste caso, também foi observado efeito negativo no número de colônias para o meio com maior concentração de CTAB ( $\chi^2 [298] = 2914.4, P=0.007$ ). Neste meio, foram observadas 31.6% menos colônias. No meio com alta concentração do reagente CTAB (Fig. 2 Alta concentração), as monocotiledôneas (MN) apresentaram a maior contagem de UFC não apresentando diferença significativa das amostras de árvores (AR) ( $P=0.26$ ). Não houve diferença significativa para os demais grupos de plantas. Para o meio com baixa concentração de CTAB (Fig. 2 Baixa concentração), o café (CF) foi à espécie que apresentou maior contagem de UFC, entretanto, não houve diferença significativa entre AR e monocotiledôneas. Banana (BN) e dicotiledôneas (DN) apresentaram as contagens de UFC mais baixas entre todas as espécies avaliadas,

não apresentando diferença entre elas. As plantas que apresentaram maior número de amostras positivas para *Metarhizium* foram CF e MN onde foram isolados *Metarhizium* de 73% das amostras (Fig. 3) e foram obtidos 37 e 39 isolados respectivamente, não diferindo de AR com 22 isolados. BN e DC apresentaram os menores números de amostras positivas para o fungo, não diferenciando entre si.

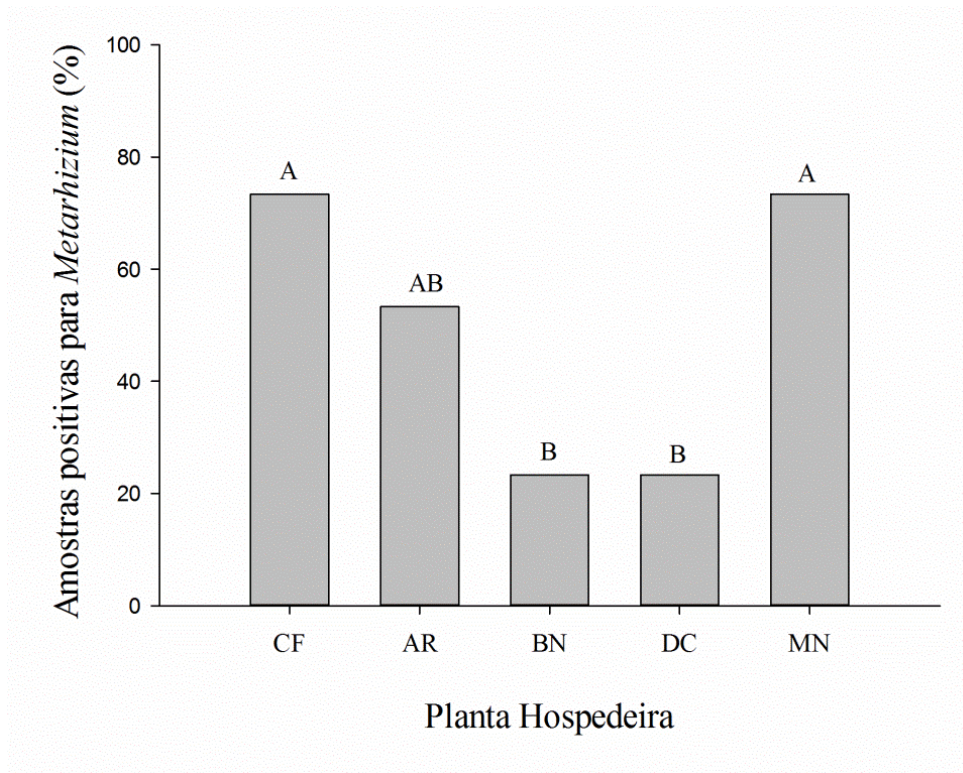
#### CTAB Alta concentração



#### CTAB Baixa concentração



**Figura 2.** Contagem total de UFC para diferentes grupos de plantas, onde: CF=Café, AR=Árvore, BN=Banana, DC=Dicotiledôneas, MN=Monocotiledôneas. A figura CTAB alta concentração indica  $0.35\text{g L}^{-1}$  e a figura CTAB baixa concentração indica  $0.175\text{g L}^{-1}$ . O nível de significância está representado pelas letras acima das hastes à  $P < 0.05$ .



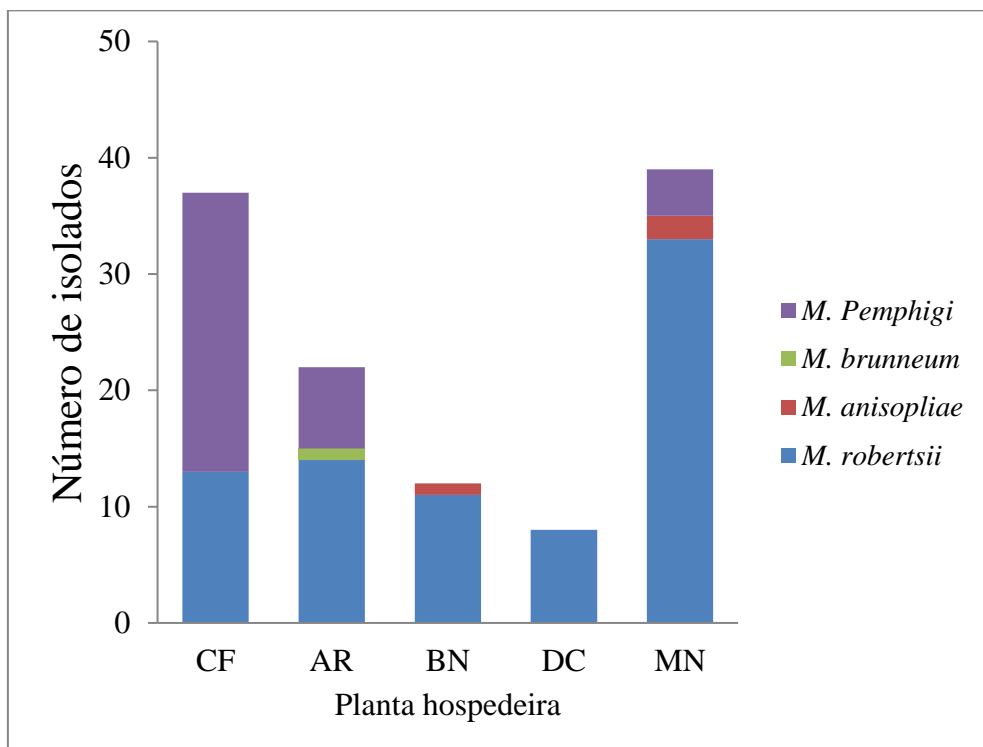
**Figura 3.** Porcentagem de amostras positivas para *Metarhizium* em relação ao grupo de plantas hospedeiras (CF=Café, AR=Árvore, BN=Banana, DC=Dicotiledôneas, MN=Monocotiledôneas). O nível de significância é indicado pelas letras acima da barra à  $P < 0.05$ .

### 3.3. Identificação dos isolados de *Metarhizium*

Foram isoladas colônias de *Metarhizium* de todos os grupos de plantas. Das 150 amostras, 74 foram positivas para o fungo. Algumas amostras continham mais de uma espécie, totalizando 118 isolados de *Metarhizium*. Durante a análise por BLAST, a média do *Query Coverage*, (porcentagem da sequência submetida ao programa que é coberta pelo alinhamento) de todas as amostras foi de 99,98%, a identidade máxima obtida por um *High-scoring Segment Pairs* de todas as amostras foi em média 99.78% e o *E-value* de todas as amostras foi de 0.0, o que indica que não houve “falso positivo”



entre as sequencias de entrada e as do banco de dados. Foram identificadas quatro espécies de *Metarhizium* sendo elas: *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. brunneum* e *M. pemphigi*. A espécie mais abundante foi *M. robertsii* totalizando 79 dos 118 isolados. Além disso, foi a única espécie presente em todos os grupos de plantas (Fig. 4). As monocotiledôneas (MN) foram as plantas que tiveram maior frequência de *M. robertsii* com 33 dos 39 isolados. Outras duas espécies encontradas nesse grupo de plantas foram *M. anisopliae* (2 isolados) e *M. pemphigi* (4 isolados). Em CF, a espécie mais frequente foi *M. pemphigi* com 24 isolados, seguido de *M. robertsii* com 13 isolados. Nas amostras de árvores (AR), foram encontrados 22 isolados de *Metarhizium*. Desses, 14 isolados são de *M. robertsii*, sete isolados de *M. pemphigi* e um isolado de *M. brunneum*. BN e DC foram às plantas com menores números de isolados, com 12 e 8 isolados respectivamente. Em BN foram encontradas 11 isolados de *M. robertsii* e um de *M. anisopliae*. Os oito isolados encontrados em DC foram identificados como *M. robertsii* (Fig. 4).



**Figura 4.** Mostra o número de isolados de cada grupo de plantas e a espécie de *Metarhizium* encontrada em cada uma delas.

#### 4. Discussão

O modelo de produção intensivo, com emprego de monocultura e elevada utilização de agrotóxicos é um dos principais fatores para a diminuição da biodiversidade de inimigos naturais de pragas agrícolas. Portanto, a adoção de práticas mais sustentáveis, como sistemas agroecológicos, pode ser uma forma de conservar a biodiversidade nesses ambientes visto que a composição de uma paisagem por diferentes tipos de habitats pode favorecer uma ampla diversidade de organismos.

Fungos entomopatogênicos são importantes componentes do ecossistema e seu papel ecológico como inimigo natural de pragas já tem sido explorado, destacando-se como alternativa ao uso intensivo de pesticidas (MEYLING *et al.*, 2007, HAJEK & LEGER, 1994). A diversidade populacional desses fungos, em sistemas agrícolas e não agrícolas, tem sido associada à biodiversidade local (MEYLING *et al.*, 2007, STEINWENDER *et al.*, 2014). Portanto, é importante compreendermos sua distribuição no ambiente e sua ocorrência natural em sistemas agrícolas e não agrícolas para melhor compreendermos seu potencial como inimigo natural de pragas. Nesse trabalho focamos em compreender a ocorrência de espécies de *Metarhizium* associados à rizosfera de plantas em cultivo de café agroflorestal.

Em relação à contagem de UFC de *Metarhizium*, as plantas hospedeiras que tiveram um maior número de colônias foram café, árvores e monocotiledôneas, e as plantas com menores números de colônias foram dicotiledôneas e banana. *Metarhizium* é um fungo de solo, que pode associar-se a raízes de plantas como endofítico ou estar associado como rizosfera competente (WYREBEK *et al.*, 2011; HU & ST LEGER 2002; FISHER *et al.*, 2011). A rizosfera de cada planta estabelece condições específicas e diferentes exudatos que pode abrigar diferentes comunidades microbianas (GRAYSTON *et al.*, 1998). Portanto, as diferenças observadas nas quantidades de isolados de *Metarhizium* em cada planta hospedeira podem estar relacionadas às diferenças na rizosfera de cada planta hospedeira.

Foram identificadas quatro espécies de *Metarhizium*, sendo elas: *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. brunneum* e *M. pemphigi*. *Metarhizium robertsii* foi a espécie mais abundante e a única presente em todos os grupos de plantas. Essa espécie é extremamente versátil, podendo ser encontrado colonizando rizosfera de plantas (HU & ST LEGER, 2002), como saprófito (XU *et al.*, 2004) e como patógenos de insetos

(ROBERTS & ST. LEGER, 2004). Em dicotiledôneas, *M. robertsii* foi a única espécie encontrada. Em monocotiledôneas e banana foi encontrada em grande quantidade. Segundo Wyrebek e colaboradores (2011), essa espécie de fungo, apesar de ser encontrada em uma ampla variedade de hospedeiros, foi mais frequente em plantas espontâneas como gramíneas e flores silvestres e tal fato pôde ser confirmado no presente trabalho. Moreira e colaboradores (2016), usando isca de *Tenebrio molitor* em amostras de solo, encontrou grande abundância de *M. robertsii*, na mesma área onde foi realizado o presente estudo. Kepler e colaboradores (2015) reportou *M. robertsii* como sendo a espécie mais abundante em solos de campos agrícolas sob diferentes manejos em Maryland, EUA, seguido de *M. brunneum* como a segunda espécie mais abundante. Pesquisas com diferentes formas de isolamento encontraram grande abundância de *M. robertsii* em diferentes habitats, o que reforça a versatilidade e predominância dessa espécie.

*Metarhizium anisopliae* foi encontrado em baixas frequências em banana e monocotiledôneas. Apesar da baixa frequência encontrada no presente trabalho, Rocha e colaboradores (2013) e Luz e colaboradores (2004) usando ninfas de *Triatoma infestans* como isca viva, encontraram *M. anisopliae* de forma abundante no cerrado brasileiro. A baixa frequência encontrada no presente trabalho pode estar relacionada ao método de isolamento usado, além disso, *M. anisopliae* pode não ser tão especializado em colonizar a rizosfera de plantas, estando mais distribuído no solo.

A espécie de *Metarhizium* mais frequente em café foi *M. pemphigi*. Fisher e colaboradores (2011) reportaram isolados de *M. pemphigi* em morangos e pinus (*Pinaceae*) em baixas frequências, portanto, parece ser a primeira vez que é reportado um grande número dessa espécie colonizando a rizosfera de uma única cultura. Tal fato sugere que *M. pemphigi* está significativamente associada à rizosfera dessa cultura em especial. Moreira e colaboradores (2016) ao coletar amostras na mesma área de estudo, usando isca de *Tenebrio molitor* em amostras de solo, não encontrou *M. pemphigi*. Essa diferença pode estar atribuída tanto ao método de isolamento quanto à preferência dessa espécie à raízes de plantas.

No presente trabalho, foi encontrado um único isolado de *M. brunneum*, em raiz de Ingá (*Inga sp.*) Parece ser a primeira vez que essa espécie é registrada em ambiente tropical. Este fungo é encontrado de forma abundante no solo e na rizosfera de plantas em áreas de clima temperado (BIDOCHKA *et al.*, 2001; WYREBEK *et al.*, 2011). Outras características são a capacidade de crescer em baixas temperaturas, crescimento

reduzido em altas temperaturas e sensibilidade a alta radiação UV (BIDOCHKA *et al.*, 2001). Entretanto, nosso estudo mostrou que sua distribuição é mais ampla que o esperado, portanto pesquisas futuras precisam ser feitas no sentido de entender melhor a distribuição e ecologia dessa espécie.

Para o isolamento de fungos entomopatogênicos a partir de substratos, como solo e raízes, diferentes meios de culturas foram desenvolvidos (DOBERSKI & TRIBE 1980; LIU *et al.*, 1993; TEFERA & VIDAL 2009; CHASE *et al.*, 1986). O agente seletivo mais usado em meios de cultura para *Metarhizium* é o fungicida Dodine (1-dodecylguanidinium acetate), um composto inibitório de muitos fungos não-entomopatogênicos (BEILHARZ *et al.*, 1982; RANGEL *et al.*, 2010; CHASE *et al.*, 1986). Entretanto, Dodine tem se tornado cada vez mais difícil de obter (Kepler *et al.*, 2015). Posadas e colaboradores (2012) testaram com sucesso o uso de CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) como alternativa ao uso de Dodine, por suas estruturas químicas serem bastante parecidas. Kepler e colaboradores (2015) testaram as duas substâncias em três concentrações para o isolamento de *Metarhizium* em solo e encontraram valores equivalentes para as duas substâncias. No presente trabalho, foram usadas duas das concentrações de CTAB propostas por Kepler e colaboradores (2015), denominadas como alta e baixa concentração. Mais UFC's de fungos entomopatogênicos foram isolados ao usar o meio com concentração mais baixa de CTAB. Em relação à proporção de isolados por planta hospedeira, o padrão foi mantido para as duas concentrações de CTAB usadas, com exceção do café, que no meio com alta concentração do reagente, a contagem de UFC tanto para fungos entomopatogênicos total quanto para *Metarhizium* foi mais baixa do que no meio com baixas concentrações de CTAB.

## **5. Conclusão**

No presente trabalho foram encontradas quatro espécies de *Metarhizium* em associação com café, árvores e plantas espontâneas. *Metarhizium robertsii* foi a espécie mais abundante e a única encontrada em associação com a rizosfera de todas as plantas coletadas, apresentando característica mais generalista. Foi encontrado um único isolado

de *M. brunneum*, na rizosfera de banana. Esse fungo é encontrado de forma abundante em ambientes de clima temperado, entretanto, parece ser a primeira vez que essa espécie é registrada em ambiente tropical. *M. pemphigi* foi encontrado em grande abundância em café e em baixa frequência em árvores e monocotiledôneas, o que pode indicar uma preferência pelo microambiente gerado pela rizosfera dessa cultura. Nesse sentido, pesquisas futuras devem ser feitas para compreender melhor as interações dessa espécie de *Metarhizium* com café, tornando-o um potencial candidato ao desenvolvimento de produtos para o tratamento protetivo de sementes dessa cultura, o que pode influenciar também como promotor de crescimento das mudas.

## 6. Referências

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: \_\_\_. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-382.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. P. 69-110.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ – **ABIC**. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home> Acesso em: 5 de março de 2017.
- BIDOCHKA, M. J.; SMALL, C. L. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: VEGA, F. E; BLACKWELL, M. (Ed.). **Insect – Fungal Associations: Ecology and Evolution**. New York: Oxford University Press, 2005. chap. 2, p. 28–50.
- BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: An additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1553–1560, 2014.
- BEHIE, S. W.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, v. 336, n. 6088, p. 1576–1577, 2012.
- BEILHARZ, V. C.; PARBERY, D. G.; SWART, H. J. Dodine: A selective agent for certain soil fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 79, n. 3, p. 507–511, 1982.
- BERKHOUT, F. Book review. **Research Policy**, v. 34, n. 9, p. 1454–1456, 2005.
- BIDOCHKA, M. J. et al. Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect-Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering Cryptic Species?. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.1335-1342, 1 mar. 2001. American Society for Microbiology.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, Richard A.. A multilocus phylogeny

of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, [s.l.], v. 101, n. 4, p.512-530, jul. 2009

BOMMARCO, R.; KLEIJN, D.; POTTS, S.G. Ecological intensification: Harnessing ecosystem services for food security. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 28, n. 4, p. 230–238, 2013.

BRUCK, D. J. Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere : implications for pest management. v. 32, p. 155–163, 2005.

CHIZZOTTI, M. L. Doctor Scientiae. **Viçosa, MG**, p. 101, 2007.

CRAWLEY M.J. (2007). *The R Book*. Wiley Publishing.

DAVIDSON, E.W. History of Insect Pathology. In: Vega, F.E.; Kaya, H.K. (Ed.). **Insect Pathology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2012. chap. 2, p. 13-28.

DOBERSKI, J. W.; TRIBE, H. T. Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 1, p. 95–100, 1980.

CHASE, A. R.; OSBORNE, L. S.; FERGUSON, V. M.. Selective Isolation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an Artificial Potting Medium. **The Florida Entomologist**, [s.l.], v. 69, n. 2, p.285-292, jun. 1986. JSTOR.

FARIA, M. R. D; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237–256, 2007.

FISHER, J. J.; REHNER, S. A; BRUCK, D. J. Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. **Journal of invertebrate pathology**, v. 106, n. 2, p. 289–95, 2011.

GAMA, M. de M. B. 2003. **Análise técnica e econômica de sistemas agroflorestais em Machadinho d'Oeste, Rondônia**. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.126 f.

GARNETT, T. et al. Sustainable Intensification in Agriculture: Premises and Policies. **Science**, [s.l.], v. 341, n. 6141, p.33-34, 4 jul. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

GRAYSTON, S. J. et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 369–378, 1998.

HAJEK, A. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 39, n. 1, p. 293–322, 1994.

HU, G.; LEGER, R. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6383–6387, 2002a.

HU, G.; LEGER, R. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6383–6387, 2002b.

JARONSKI, S. T. Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management ,

2007 : ISBN : 978-81-308- 0192-6 **Editors : Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes : A critical examination**

KEPLER, R. M. et al. Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 17, n. 8, p.2791-2804, 4 mar. 2015.

KEPLER, R. M. et al. Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. **Environmental Microbiology**, p. n/a-n/a, 2015.

LACEY, L. M.; LACEY, L. A.; ROBERTS, D. W. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 108–118, 1988.

LIU, Z. Y. et al. **The Use of Dodine in Selective Media for the Isolation of *Metarhizium* spp. from Soil** **Journal of Invertebrate Pathology**, 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022201183711079>>

LOSEY, J. E.; VAUGHAN, M.; ANONYMOUS. The economic value of ecological services provided by insects. **Bioscience**, v. 56, n. 4, p. 311–323, 2006.

LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; NERY, G. V. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic triatomine-infested areas in Central Brazil and fungal activity against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera : Reduviidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 783–791, 2004.

MAZZA, G. et al. An overview on the natural enemies of *Rhynchophorus palm weevils*, with focus on *R. ferrugineus*. **Biological Control**, v. 77, p. 83–92, 2014.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, n. 2, p. 145–155, 2007.

MOREIRA C.M., MIZUBUTI E.S.G., HORA JÚNIOR B.T., ELLIOT S.L. ***Metarhizium* associated to coffee based agroforestry and full sun systems: molecular community characterization and population genetics**. 132p. Tese (Doutorado em Biologia) - Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2016

MOREIRA C.C., CELESTINO D., GUERRA T.G., CARDOSO I.M. & ELLIOT S.L. (submitted). Ecosystem services offered by entomopathogenic fungi: Agroforestry coffee soils are more insect suppressive than Full-sun soils. *Submitted to Journal of Invertebrate Pathology*.

OLIVEIRA, C.C.A. **Sistemas Agroflorestais com café: Fixação e neutralização de carbono e outros serviços ecossistêmicos**. 141p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2003.

POSADAS, J. B. et al. A novel dodine-free selective medium based on the use of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) to isolate *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* sensu lato and *Paecilomyces lilacinus* from soil. **Mycologia**, v. 104, n. 4, p. 974–980, 2012.

- RANGEL, D. E. N. et al. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 4, p. 375–389, 2010.
- ROBERTS, D. W.; ST. LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, v. 54, p. 1–70, 2004.
- ROCHA, L. F. N. et al. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 3, p. 251–9, 2013.
- RODRIGUES, J. et al. Effect of formulated *Metarhizium anisopliae* on eggs and eclosing nymphs of *Triatoma infestans*. **Journal of Applied Entomology**, v. 139, n. 1–2, p. 146–153, 2015.
- SANTOS, A. H. et al. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**, v. 50, n. 1, p. 37–42, 2009.
- SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 101–107, 2012.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5–6, p. 413–423, 2003.
- STEINWENDER, B. M. et al. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 123, p. 6–12, 2014.
- STEINWENDER, B. M. et al. Root isolations of *Metarhizium* spp. from crops reflect diversity in the soil and indicate no plant specificity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 142–148, 2015.
- SUNG, G. H. et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, p. 5–59, 2007.
- TEFERA, T.; VIDAL, S. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **BioControl**, v. 54, n. 5, p. 663–669, 2009.
- TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671–677, 2002.
- TSCHARNTKE, T. et al. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity - Ecosystem service management. **Ecology Letters**, v. 8, n. 8, p. 857–874, 2005.
- VALERI, S.V., POLITANO, W., SENO, K. C. A., BARRETO, A. L. **Manejo e recuperação Florestal**. Jaboticabal, Funep. 180p, 2003.
- VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149–159, 2009.
- WYREBEK, M. et al. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. **Microbiology**, v. 157, p. 2904–2911, 2011.
- XU, C. et al. A high-throughput gene disruption methodology for the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus



*Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879–920, 2007.