

Caracterização Molecular de Fungos Entomopatogênicos Utilizados no Controle Biológico de Pragas do Milho - *Beauveria bassiana* versus *Spodoptera frugiperda*

Andréa Almeida Carneiro¹
Eliane Aparecida Gomes²
Luciane Francisca Vieira Nonato³
Wellerson M.A. Britto³
Fernando Tavares Fernandes¹
Newton Portilho Carneiro¹
Claudia Texeira Guimarães¹
Ivan Cruz¹

Introdução

Um dos grandes problemas enfrentados pela agricultura mundial diz respeito ao uso constante e muitas vezes indiscriminado dos agrotóxicos, causando, em muitos casos, resistência dos insetos aos inseticidas e a redução ou eliminação da população de inimigos naturais de pragas, a contaminação ambiental, além do aumento de custo de produção. Pesticidas não são tóxicos só para as pragas, mas também para os homens, os animais domésticos e silvestres e para a natureza como um todo, podendo deixar resíduos nos alimentos e/ou na água. Portanto, para evitar os problemas acarretados pelos agrotóxicos, torna-se imperativa a busca de medidas alternativas para o controle de pragas (Valicente e Cruz, 1991).

Uma das alternativas é baseada no controle biológico, uma vez que vários agentes de

controle natural de insetos já foram identificados, seja dentro da classe Insecta ou dentre os microrganismos. O controle biológico, em sua essência, pode ser considerado como o uso de organismos vivos para manter a população de determinada praga em equilíbrio no agrossistema, de modo a não ocasionar danos econômicos ao produtor. Existem na natureza vários organismos que utilizam, para sua sobrevivência, como alimento, os insetos-praga. Pássaros, aves, aranhas, vários tipos de insetos, fungos, bactérias, vírus e muitos outros organismos têm papel importante no controle de pragas (Valicente e Cruz, 1991).

O controle biológico feito por microrganismos entomopatogênicos, como vírus, bactérias, fungos, protozoários e nematóides, exerce papel importante na regulação do número de insetos. Um grande

¹Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, CP 151 - 35701-970 Sete Lagoas-MG, andrea@cnpmms.embrapa.br, tavares@cnpmms.embrapa.br, newtonc@cnpmms.embrapa.br, claudia@cnpmms.embrapa.br, ivancruz@cnpmms.embrapa.br

²Técnico de Nível Superior. Embrapa Milho e Sorgo. eliane@cnpmms.embrapa.br

³Estudantes de Graduação Ciências Biológicas – Centro Universitário Izabela Hendrix – Rua da Bahia – Lourdes, 2020 Belo Horizonte – MG. lfvbio@hotmail.com, wellrb@hotmail.com

número de espécies de pragas é afetado pelas doenças microbianas, que podem reduzir ou até mesmo eliminar a capacidade de provocar danos à planta hospedeira.

Entre os agentes causais de doenças infecciosas em insetos, os fungos ocupam um lugar de destaque, sendo os primeiros agentes de infecção de natureza microbiana identificados em insetos. Entre os fungos entomopatogênicos mais conhecidos e estudados estão os dos gêneros *Entomophthora*, *Cordyceps*, *Aschersonia*, *Metarhizium*, *Beauveria* e *Nomuraea*.

A lagarta-do-cartucho na cultura do milho

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) é a principal praga da cultura do milho, no Brasil (Figura 1), e, nos últimos anos, sua incidência e severidade vêm aumentando em várias áreas cultivadas (Cruz, 1995; Cruz et al., 1999). O inseto também ataca e causa danos a várias outras culturas de importância econômica, como o sorgo, trigo, arroz, alfafa, feijão, amendoim, tomate, batata, repolho, espinafre, abóbora e couve (Cruz et al., 1999). Em anos recentes, tem-se tornado também uma praga ameaçadora ao cultivo de algodão (Cruz et al., 1999). Quando infestando o milho, alimenta-se em todas as fases de crescimento da planta, mas tem preferência por cartuchos e pode causar perdas de até 37% da produção, se não controlada.

A lagarta-do-cartucho do milho foi descrita como praga, em 1797, na Geórgia, Estados Unidos. O inseto pode ser encontrado nas Américas e em algumas ilhas a oeste da Índia (Cruz, 1995). Nos Estados Unidos, os insetos sobrevivem, no inverno, nas regiões tropicais do sul da Flórida e no Texas, de onde as mariposas migram durante a primavera, verão e outono, podendo se deslocar a grandes distâncias, atingindo as regiões ao norte do país, chegando até o

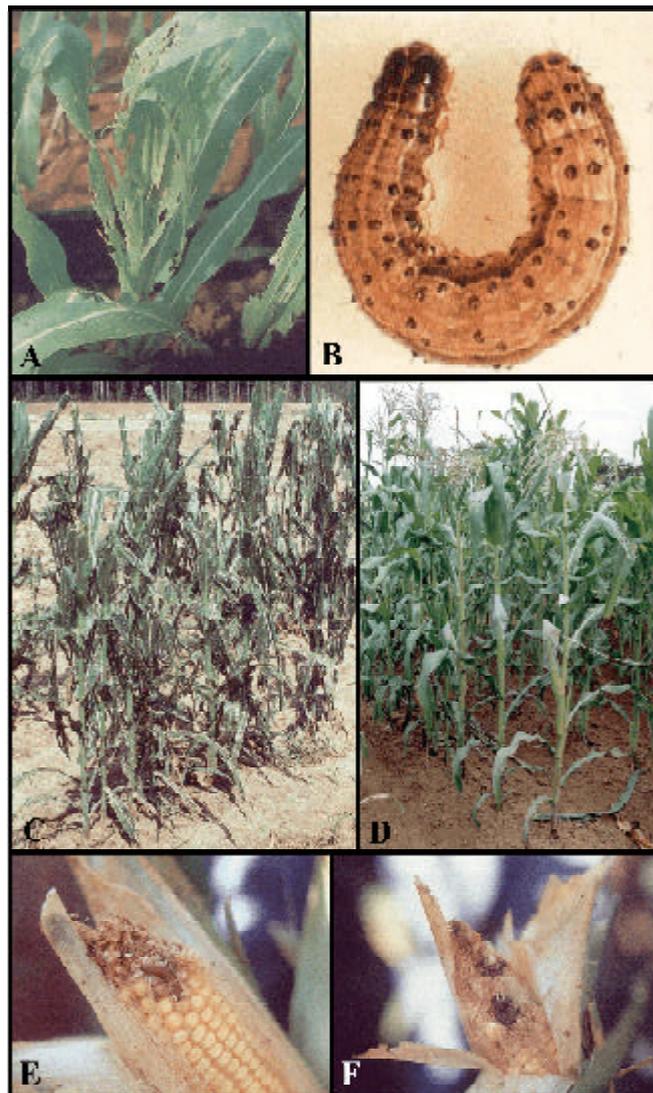


Figura 1. *Spodoptera frugiperda* (Lagarta-do-cartucho) e a cultura do milho. (A) Danos típicos causados pela lagarta-do-cartucho na cultura do milho; (B) Lagarta-do-cartucho completamente desenvolvida (tamanho real igual a 4,5 cm); (C) Danos severos provocados pela lagarta-do-cartucho em plantações de milho; (D) Campo de cultivo de milho sem o ataque da lagarta-do-cartucho; (E e F) Danos causados pela lagarta-do-cartucho na ponta da espiga de milho.

Canadá. No Brasil, em função da alimentação diversificada e disponível o ano todo e das condições de clima favoráveis ao inseto, a sua distribuição é geral em todas as regiões do território nacional (Cruz, 1995).

O primeiro grande surto registrado na história ocorreu em 1899, quando uma grande parte dos Estados Unidos, a leste das Montanhas Rochosas, foi invadida pela lagarta-do-cartucho, causando severos danos em milho, feijão, arroz, sorgo e trigo.

Em 1902, cerca de 40.000 acres de pastagens foram severamente danificados pelo inseto, no Texas. Também nos Estados Unidos, ataques intensos foram verificados em aveia, algodão e pastagens. Tem sido considerada a principal praga de milho, pastagem e amendoim nos estados americanos do Sudeste. No Brasil, um surto foi relatado em 1964, com enormes danos em milho, arroz e pastagens. O inseto é também considerado uma das pragas mais importantes do milho na Colômbia, Venezuela, Guatemala, México, Peru e Chile (Cruz, 1995).

A fêmea coloca seus ovos nas folhas do milho (Figura 2). As larvas de primeiro ínstar geralmente iniciam sua alimentação nos tecidos verdes de um lado da folha, deixando a epiderme membranosa do outro lado intacta, causando o sintoma conhecido como "folhas raspadas". Larvas maiores começam a fazer buracos na folha e, quando estão entre o quarto e o sexto ínstares (oito a 14 dias), podem destruir completamente pequenas plantas ou causar severos danos em plantas maiores. O maior dano é feito por larvas de quinto e sexto ínstares. A lagarta pode também se alimentar na base do colmo, causando o sintoma conhecido como "coração morto", podendo causar a morte ou o perfilhamento da planta. Muitas vezes, especialmente quando o milho é muito precoce e/ou as infestações ocorrem mais tarde, a larva já bem desenvolvida dirige-se para a região da espiga, atacando o pedúnculo e impedindo a formação dos grãos.

No Brasil, reduções no rendimento do milho devido ao ataque da lagarta-do-cartucho chegam a 37%. Esse percentual de danos depende da fase de desenvolvimento da planta em que ocorre o ataque, sendo as plantas no estágio de oito a dez folhas as mais sensíveis. As perdas econômicas causadas pela lagarta-do-cartucho na cultura do milho são estimadas em mais de 400 milhões de dólares (Cruz, 1995).

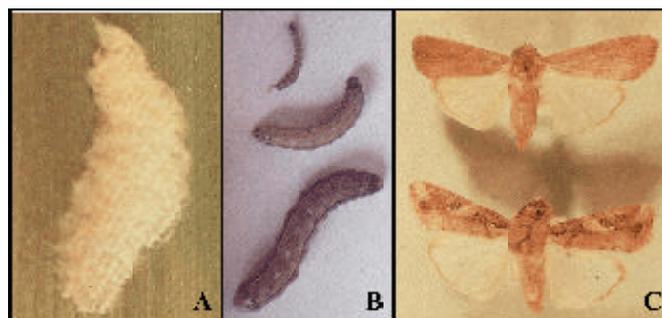


Figura 2. Fases de desenvolvimento da *Spodoptera frugiperda*. (A) Posturas de *S. frugiperda* em folhas de milho; (B) Lagartas de *S. frugiperda* de diferentes idades; (C) Mariposa fêmea (no alto) e macho (embaixo) de *S. frugiperda*.

O controle de *S. frugiperda* no milho é feito utilizando-se produtos químicos, que são aplicados com o aparecimento dos primeiros sintomas de danos na cultura. Entretanto, o uso constante desses produtos tem gerado problemas, como o desenvolvimento de resistência e a redução da população de inimigos naturais. Assim, o desenvolvimento de medidas de controle com menor impacto ambiental tende a manter o sistema de produção mais sustentável.

Controle biológico de *S. frugiperda* utilizando o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana é um deuteromiceto cosmopolita, com alta patogenicidade e grande abrangência entomopatogênica (Figura 3). Atualmente, esse fungo vem sendo estudado em todo o mundo como um micoinseticida (Riba e Silvy, 1989), sendo já comercializado como pó solúvel de conídios para uso agrícola e doméstico. Muitos estudos têm mostrado que certos isolados de *B. bassiana* são eficazes no controle de lepidópteros, como a lagarta-do-cartucho, (Cruz, 1995).

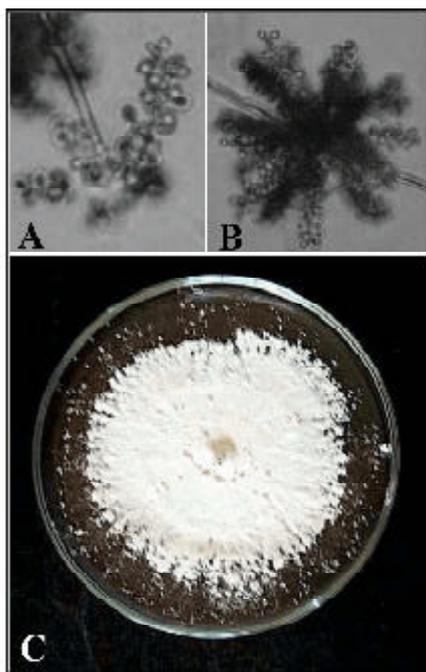


Figura 3. Aspectos morfológicos de *Beauveria bassiana*. (A) Fiálide com conídeos agrupados em ziguezague; (B) Grupo de fiálides com conídeos formando um conidióforo; (C) Aspecto macroscópico de uma colônia de *B. bassiana* crescendo em meio de cultivo BDA.

O mecanismo de infecção de *B. bassiana* é o mesmo para todos os insetos. O fungo penetra na cutícula, através de uma combinação de pressão e degradação enzimática (Ferron 1978). Após atravessar o integumento, o patógeno atinge os tecidos internos e as hifas proliferam, até a morte do inseto, que ocorre entre três e sete dias após a infecção (Figura 4). A morte dos insetos é devido à digestão dos tecidos internos e à ação de micotoxina, que é lançada na hemolinfa (Hajek e St. Leger, 1994). Diferenças quanto à virulência estão associadas à eficiência na infecção, que depende da dureza (determinada pelo grau de esclerotização) e das diferenças estruturais da cutícula (Hajek e St. Leger, 1994). Vários trabalhos descrevem diferenças quanto à patogenicidade entre isolados de *B. bassiana*. Entretanto, poucos estudos foram realizados para determinar variabilidade genética entre isolados. Portanto, para se avaliar o potencial dos inóculos encontrados no Brasil, no controle de pragas tais como a *S. frugiperda*, é necessária a caracterização dos isolados a serem estudados.

O Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo vem realizando bioensaios para avaliar a virulência de isolados de *B. bassiana* contra a *S. frugiperda*. Basicamente, os bioensaios consistem da contaminação de lagartas por meio de suspensões de conídios dos fungos, em água destilada, e avaliação das taxas de mortalidade das mesmas. Discos foliares de milho são imersos nas suspensões de conídios e oferecidos para as lagartas de *S. frugiperda*. Após 24 h, os discos foliares são substituídos por dieta artificial. Os experimentos são mantidos em salas de crescimento à temperatura constante de 25°C. As avaliações são realizadas diariamente, por um período de dez dias, tendo como base a mortalidade dos insetos.



Figura 4. *Spodoptera frugiperda* infectada pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*.

Utilização da biologia molecular na caracterização da diversidade genética de isolados de *Beauveria bassiana*

Os métodos fenotípicos (morfologia, testes bioquímicos e sorológicos), associados às técnicas de biologia molecular, apresentam-se como uma estratégia importante para a caracterização e identificação do germoplasma microbiano (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Nour et al., 1995; Oliveira et al., 1999).

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma variação da técnica de PCR, que utiliza um único oligonucleotídeo iniciador de dez nucleotídeos com seqüência arbitrária. Com isso, são amplificados fragmentos de DNA distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da seqüência do DNA. Marcadores RAPD são altamente sensíveis a diferenças de nucleotídeos entre DNA molde e os oligonucleotídeos iniciadores, permitindo a detecção de mudanças em um único nucleotídeo. Tais características tornam os marcadores RAPD ideais para a detecção de diferenças em indivíduos relacionados e em espécies pouco polimórficas (Williams et al., 1990). A técnica de RAPD tem sido utilizada na análise da variabilidade genética de isolados de *B. bassiana*, por ser de fácil execução, de custo relativamente reduzido e eficiente na detecção de polimorfismo (Castrillo et al., 1999; Castrillo e Brooks, 1998; Berretta et al., 1998; Bidochka et al., 1994).

Outra técnica que vem sendo muito aplicada na caracterização molecular de microrganismos é o seqüenciamento e comparação de subunidades do DNA ribossômico. Os genes codificadores das subunidades ribossômicas estão dispostos em repetições, em um único cromossoma. Pelo fato de apresentar-se em repetições, o rDNA torna-se um alvo de recombinações não homólogas, ocasionando inserções ou

deleções nucleotídicas. As diferentes regiões do rDNA apresentam diferentes taxas de mutação, o que permite um estudo comparativo em níveis taxonômicos, que variam de famílias até populações isoladas de uma mesma espécie. A subunidade pequena do rDNA sofre mutações ou evolui vagarosamente e é útil para estudar as distâncias entre os organismos, enquanto que os ITS (Internal Transcribed Spacer) desenvolvem-se mais rapidamente e podem variar entre as espécies, sendo utilizados para a caracterização de diferentes isolados (White et al., 1997).

A Embrapa Milho e Sorgo vem procurando novas alternativas de controle da lagarta-do-cartucho. Em campos cultivados de milho, foram coletadas diversas lagartas infectadas por fungos entomopatogênicos. Esses fungos, além de não prejudicarem as lavouras, reduzem o desenvolvimento e podem até causar a morte dos insetos-praga, constituindo-se em seus inimigos naturais. Dentre as colônias isoladas dos diversos fungos coletados em campo, algumas mostraram-se morfologicamente idênticas, enquanto outras apresentaram um fenótipo distinto. As variações fenotípicas freqüentemente estão correlacionadas com as variações genotípicas, exceto em casos quando o fenótipo é determinado por condições ambientais. Variações genotípicas podem ser acessadas usando vários marcadores genéticos; esses marcadores, por sua vez, podem ser utilizados como etiquetas para os isolados selecionados.

Neste trabalho, objetivou-se estudar as variações dentre populações de *Beauveria bassiana* associadas à *S. frugiperda*. Para a identificação de microrganismos com potencial de uso como agentes para o controle biológico da lagarta-do-cartucho, fungos isolados de lagartas mortas coletadas no campo foram avaliados utilizando marcadores RAPD e seqüenciamento de regiões ITS de genes que codificam para o rDNA.

Foram utilizados isolados de *B. bassiana* da coleção de fungos da Embrapa Milho e Sorgo, coletados nos campos experimentais de milho, em Sete Lagoas. Culturas monospóricas dos isolados foram mantidas em meio batata dextrosado líquido (Wagner e Lewis, 2000) a 25°C, por cinco dias, para a obtenção de micélio e extração de DNA.

DNA foi extraído de 0,5 g de micélio fresco de fungos, de acordo com o protocolo descrito por Lee e Taylor (1990). O DNA dos isolados de *B. bassiana* foi amplificado por PCR, utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos iniciadores comercializados pela Operon Technologies Inc. (Alameda, Califórnia, USA): OPB1, OPB8, OPC4, OPE6, OPE8, OPE9, OPQ4, OPZ12, OPZ13, OPZ19, OPO2 e OPO12. As reações foram feitas com uma desnaturação inicial de 1 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (30'' - 94°C, 1' - 36°C, 2' - 72°C), e uma extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE. Os géis foram tratados com brometo de etídeo, visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene). Os produtos de amplificação foram avaliados com presença (1) e ausência (0), utilizando o complemento do índice de similaridade de Jaccard para calcular a distância genética, entre os pares de isolados. A análise de agrupamento foi feita baseada na matriz de distância genética, utilizando o método UPGMA, disponível no programa Statistica, versão 4.2.

A amplificação da região ITS (Internal Transcribed Sequence) do rDNA de *Beauveria bassiana* foi feita utilizando os primers ITS1 5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' e ITS4 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'. DNA foi amplificado após 40 ciclos, cada um consistindo de uma desnaturação a 94°C por 60 seg, um anelamento a 50°C por 60 seg e uma extensão a 72°C por 90 Seg, seguido de uma

extensão final a 72°C por 7 min. O seqüenciamento dos fragmentos amplificados foi feito em um Seqüenciador Automático ABI 3100. As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com seqüências depositadas no GenBank Nucleotide Database, utilizando os programas BLAST e Clustal 1.6.

Diferenciação de estirpes de *Beauveria bassiana* utilizando RAPD e seqüenciamento de regiões ITS

O gênero *Beauveria* é um patógeno de grande número de artrópodos, ocorrendo em mais de 200 espécies de inseto e ácaros, incluindo carrapatos. Isolados de *Beauveria bassiana* foram obtidos de lagartas mortas de *Spodoptera frugiperda* com aspecto cotonoso, em diferentes campos de cultivo de milho de Sete Lagoas. Observação dos microcultivos, originados de culturas monospóricas, dos diversos isolados, revelou a presença de micélio abundante, septado e de cor branca, conídios ovóides suportados por fiálides, com a porção terminal em zigue-zague. DNAs isolados de três fungos diferentes foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando primers para a região ITS do rDNA. O seqüenciamento da banda de 600 bp amplificada revelou uma homologia de mais de 97,0% com seqüências do rDNA de *B. bassiana* depositadas no GenBank Nucleotide Database (Figura 5). O DNA dos fungos, morfológica e molecularmente identificados como *B. bassiana*, foi analisado por técnicas de RAPD, com o objetivo de acessar as variações dentre populações do fungo associadas com o mesmo inseto hospedeiro, *S. frugiperda*.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
1	AF291871	CGCGGAAAGGAG	CGGAGGG--ATGAA	AGCCAGCTTTCAGAT	CCC--TAAGCCCTT	GTGAGCCGAAAG	AGC	CGTTCCTGGCGA					84
2	AF291872	CCU...CGGAAAGGAG	CGGAGGG--ATGCA	AGCCAGCTTTCAGAT	CCC--TAAGCCCTT	GTGAGCCGAAAG	AGC	CGTTCCTGGCGA					85
3	AF347611		AGAGGGG ATCAGC	AGCCAGCTTTCAGAT	CCC TAAGCCCTT	GTGAGCCGAAAG	AGC	CGTTCCTGGCGA					89
4	15-ITS1	-----	--GAGGCT--ATGCT	--CCCTGCTTTCAGAT	CCGC--TTTAAAGCTT	GTGAGCCGAAAG	AGC	CGTTCCTGGCGA					90
5	07-ITS1	-----	--GAGGCT--ATGCT	--CTTCTTAAAGCT	CCCT--TCTGCTT	GTGAGCCGAAAG	AGC	CGTTCCTGGCGA					93
6	22-ITS1	-----	GAGGGCTANTCT	CCGCTTCTTCAACT	CCCTTCTTCTCTT	GTGAGCCGAAAG	AGC	CGTTCCTGGCGA					92
		105	106	20	171	185	186	150	151	165	166	180	
1	AF291871	CTCGGCGGAGGCGG	GA GCGGGA CTGGA	CGAGGGGGCGGCGG	GGGA CCTTAAAGCT	TTGTAATCCAGCAGC		TTCTGGAAATAGCGCG					162
2	AF291872	CTCGGCGGAGGCGG	GA GCGGGA CTGGA	CGAGGGGGCGGCGG	GGGA CCTTAAAGCT	TTGTAATCCAGCAGC		TTCTGGAAATAGCGCG					170
3	AF347611	CTCGGCGGAGGCGG	GA GCGGGA CTGGA	CGAGGGGGCGGCGG	GGGA CCTTAAAGCT	TTGTAATCCAGCAGC		TTCTGGAAATAGCGCG					174
4	15-ITS1	CGGAGCGGAGGCGG	GNAGCGGAGACTGGA	--CGAGCGGCGGCGG	GGGA--CCTTAAAGCT	TTCTATCCAGCAGC		TTCTGGAAATAGCGCG					177
5	07-ITS1	CGGAGCGGAGGCGG	GNAGCGGAGACTGGA	--CGAGCGGCGGCGG	GGGA--CCTTAAAGCT	TTCTATCCAGCAGC		TTCTGGAAATAGCGCG					177
6	22-ITS1	AGCTCGGCGGAGGCGG	GNAGCGGAGACTGGA	AGGAGGGGGCGGCGG	GGGAAAGCTTAAAGCT	TTGTAATCCAGCAGC		TTCTGGAAATAGCGCG					182
		195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
1	AF291871	AGCTCGGAGAGGAG	AA GAAAGCTTTCAG	CGAGCGATCTCTGGG	CGCGGGA GGTGA	AGGAGCCAGTCAAGT		CGGAGAGTATGTC					259
2	AF291872	AGCTCGGAGAGGAG	AA GAAAGCTTTCAG	CGAGCGATCTCTGGG	CGCGGGA GGTGA	AGGAGCCAGTCAAGT		CGGAGAGTATGTC					260
3	AF347611	AAGGCGAAGAGGAG	AACTAAAGCTTTCAG	CGAGCGATCTCTGGG	CGCGGGGATGATGA	AGGAGCCAGGCAAGT		CGGATAGTATGTC					264
4	15-ITS1	AAGCGAAGAGGAG	AACTAAAGCTTTCAG	CGAGCGATCTCTGGG	CGCGGGGATGATGA	AGGAGCCAGGCAAGT		CGGATAGTATGTC					267
5	07-ITS1	AAGGCGAAGAGGAG	AACTAAAGCTTTCAG	CGAGCGATCTCTGGG	CGCGGGGATGATGA	AGGAGCCAGGCAAGT		CGGATAGTATGTC					267
6	22-ITS1	AGCTCGGAGAGGAG	AA GAAAGCTTTCAG	CGAGCGATCTCTGGG	CGCGGGA GGTGA	AGGAGCCAGTCAAGT		CGGAGAGTATGTC					262
		271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360
1	AF291871	AATTCGAGAGGAG	CGAATCATGGATCT	TTGAAAGGACAGTGG	CGCGGGCAGCATT	GGCGGGGATGCGCGT		TCGAGC GCTATTC					348
2	AF291872	AATTCGAGAGGAG	CGAATCATGGATCT	TTGAAAGGACAGTGG	CGCGGGCAGCATT	GGCGGGGATGCGCGT		TCGAGC GCTATTC					348
3	AF347611	AATTCGAGAGGAG	CGAATCATGGATCT	TTGAAAGGACAGTGG	CGCGGGCAGCATT	GGCGGGGATGCGCGT		TCGAGCGCTATTC					354
4	15-ITS1	AATTCGAGAGGAG	CGAATCATGGATCT	TTGAAAGGACAGTGG	CGCGGGCAGCATT	GGCGGGGATGCGCGT		TCGAGCGCTATTC					356
5	07-ITS1	AATTCGAGAGGAG	CGAATCATGGATCT	TTGAAAGGACAGTGG	CGCGGGCAGCATT	GGCGGGGATGCGCGT		TCGAGC GCTATTC					356
6	22-ITS1	AATTCGAGAGGAG	CGAATCATGGATCT	TTGAAAGGACAGTGG	CGCGGGCAGCATT	GGCGGGGATGCGCGT		TCGAGC GCTATTC					341
		361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450
1	AF291871	AAGCTCGAGAGGAG	CTGGGAGGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	TAC--AGCTCGGCTT		TGAA GGAATCTCG					437
2	AF291872	AAGCTCGAGAGGAG	CTGGGAGGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	TAC--AGCTCGGCTT		TGAA GGAATCTCG					438
3	AF347611	AAGCTCGAGAGGAG	CTGGGAGGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	TAC--AGCTCGGCTT		TGAA GGAATCTCG					423
4	15-ITS1	AAGCTCGAGAGGAG	CTGGGAGGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	TAC--AGCTCGGCTT		TGAA GGAATCTCG					423
5	07-ITS1	AAGCTCGAGAGGAG	CTGGGAGGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	TAC--AGCTCGGCTT		TGAA GGAATCTCG					423
6	22-ITS1	AAGCTCGAGAGGAG	CTGGGAGGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	CTTTCGGAGCTTCT	TAC--AGCTCGGCTT		TGAA GGAATCTCG					457
		461	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540
1	AF291871	CGCTTCGGTACTAAT	ACAGCTCGAGAGGAG	ACCGGAGGCGGCGA	ACCGGAGGCGGCGA	CGCGGTAAAGACAGC		AAGTTCGGAAGCTG					527
2	AF291872	CGCTTCGGTACTAAT	ACAGCTCGAGAGGAG	ACCGGAGGCGGCGA	ACCGGAGGCGGCGA	CGCGGTAAAGACAGC		AAGTTCGGAAGCTG					528
3	AF347611	CGCTTCGGTACTAAT	ACAGCTCGAGAGGAG	ACCGGAGGCGGCGA	ACCGGAGGCGGCGA	CGCGGTAAAGACAGC		AAGTTCGGAAGCTG					510
4	15-ITS1	CGCTTCGGTACTAAT	ACAGCTCGAGAGGAG	ACCGGAGGCGGCGA	ACCGGAGGCGGCGA	CGCGGTAAAGACAGC		AAGTTCGGAAGCTG					510
5	07-ITS1	CGCTTCGGTACTAAT	ACAGCTCGAGAGGAG	ACCGGAGGCGGCGA	ACCGGAGGCGGCGA	CGCGGTAAAGACAGC		AAGTTCGGAAGCTG					516
6	22-ITS1	CGCTTCGGTACTAAT	ACAGCTCGAGAGGAG	ACCGGAGGCGGCGA	ACCGGAGGCGGCGA	CGCGGTAAAGACAGC		AAGTTCGGAAGCTG					521
		541	555	556	570	571	585	586					
1	AF291871	GGACTACCGGCTGAA	CTTARGCATATCAAT	AGCG-----			561						
2	AF291872	GGACTACCGGCTGAA	CTTARGCATATCAAT	A			559						
3	AF347611	GGACT					518						
4	15-ITS1	GGACTACCGGCTGAA	CTTARGCATATCAAT	AGCGGGG			559						
5	07-ITS1	GGACTACCGGCTGAA	CTTARGCATATCAAT	AGCGGGGAGG			558						
6	22-ITS1	GGACTACCGGCTGAA	CTTARGCATATCAAT	AGCGGGG			559						

Figura 5. Homologia entre seqüências ITS de *Beauveria bassiana*. Seqüências 1, 2, e 3 foram retiradas do GenBank Nucleotide Database com os números de acesso AF 291871, AF 291872, e AF 347611, respectivamente. Seqüências 4, 5, e 6 foram provenientes de DNA extraído de fungos isolados de lagartas *S. frugiperda* mortas, coletadas nos campos de cultivo de milho da Embrapa Milho e Sorgo.

Nas análises de RAPD, dez oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados e amplificaram 53 bandas, das quais 33 foram polimórficas entre os isolados. O número de fragmentos amplificados variou de 3 (OPB8) a 7 (OPO2 e OPO12), com uma média de 5,3 bandas por oligonucleotídeo, não sendo verificada nenhuma banda no controle negativo. O tamanho das bandas ficou entre 300 (OPZ19) e 3.800 (OPE9) pares de bases. Na Figura 6, está apresentado, como exemplo, o padrão de amplificação obtido com o oligonucleotídeo OPQ4.

causa da ausência da fase perfeita. Esse fungo se reproduz preferencialmente via assexual e é predominantemente haplóide. Fungos que se reproduzem via assexual são geralmente menos diversos que os microrganismos que possuem reprodução sexual, devido à ausência de recombinação genética, exceto em casos de hibridização somática e/ou ciclo parassexual, que podem compensar a ausência de reprodução sexual (Burdon, 1993). Na maioria dos casos, as variações genéticas desses microrganismos são devido às mutações.

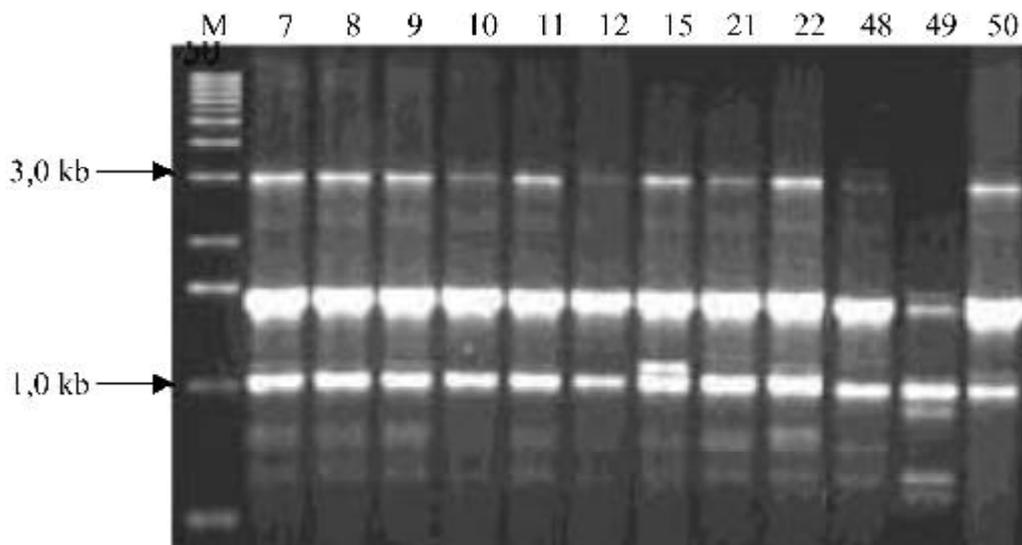


Figura 6. RAPD utilizando DNA total de *Beauveria bassiana* e o oligonucleotídeo iniciador OPQ4. Os números 7, 8, 10, 11, 12, 21, 22, 48, 49 e 50 correspondem aos diferentes isolados de *B. bassiana*.

A técnica de RAPD, como pode ser observado no dendrograma apresentado na Figura 7, foi capaz de diferenciar os isolados de *B. bassiana* obtidos numa mesma localidade, mostrando-se eficiente para a caracterização da variabilidade genética. Portanto, diferentes estirpes de *B. bassiana* podem ser caracterizadas por essa técnica antes de serem liberadas em um agroecossistema como agentes de controle biológico, garantindo a possibilidade de detectar o patógeno introduzido "versus" a estirpe nativa do mesmo fungo.

B. bassiana é classificado entre os fungos imperfeitos da classe deuteromicetos, por

Apesar de a reprodução ser assexual, a espécie *B. bassiana* apresentou uma considerável variabilidade genética, devido à sua ubiquidade, ampla distribuição geográfica e larga faixa de hospedeiros. Esse polimorfismo genético pode conferir ao microrganismo uma plasticidade para se adaptar e sobreviver em ambientes heterogêneos. Mesmo considerando que todos os isolados analisados foram coletados do mesmo hospedeiro (*S. frugiperda*), parte do ciclo de vida do fungo ocorre no solo, competindo com outros microrganismos e interagindo com vários fatores abióticos.

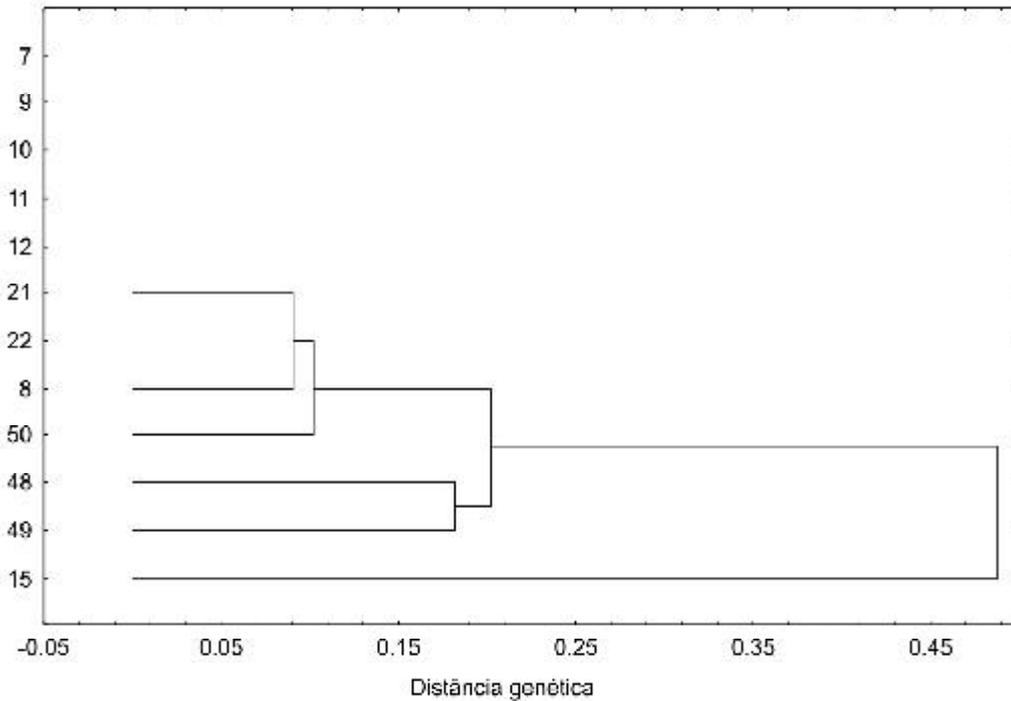


Figura 7. Análise de agrupamento entre 12 isolados de *B. bassiana* baseados em dados de RAPD, utilizando a técnica de UPGMA. A distância genética entre os isolados variou de 0% a 54%. As maiores distâncias genéticas foram verificadas entre o isolado 15 e os demais fungos. Isolados 7, 8, 10, 11, 12, 21 e 22 não apresentaram nenhuma diferença entre os oligonucleotídeos utilizados.

O uso de *B. bassiana* no biocontrole da lagarta-do-cartucho terá efeitos positivos para o aumento da produtividade do milho e possibilitará a redução no uso de agrotóxicos. A diminuição da aplicação de inseticidas irá melhorar a qualidade dos alimentos e reduzirá o impacto nocivo dos agroquímicos no ambiente, na saúde humana e animal. Em conjunto, esses procedimentos possibilitarão reduzir os custos de produção, promoverão o uso e a conservação de recursos naturais e irão melhorar a qualidade de vida humana, na medida que preservarem e melhorarem as condições ambientais. Como consequência, prevêem-se efeitos de redução nos custos de produção, aumento da produtividade e melhoria na sustentabilidade dos processos produtivos. Esse estudo resultará em benefícios diretos ao pequeno produtor brasileiro, pela facilidade de utilização e pelo menor custo das tecnologias geradas, que disponibilizarão fungos entomopatogênicos eficazes no controle de doenças e pragas.

Referências bibliográficas

- BERRETTA, M. F.; LECUONA, R. E.; ZANDOMENI, R. O.; GRAU, O. Genotyping Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with Fluorescent Labels. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 71, p. 145–150, 1998.
- BIDOCHKA, M. J.; MCDONALD, M. A.; ST. LEGER, R. J. ST.; ROBERTS, D. W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, New York, v. 25, n. 2, p. 107-113, 1994.
- BURDON, J. J. The structure of pathogen populations in natural plant communities. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 305-323, 1993.
- CASTRILLO, L. A.; BROOKS, W. M. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 72, n. 3,

p. 190-196, 1998.

CASTRILLO, L. A.; WIEGMANN, B. M.; BROOKS, W. M. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 73, n. 3, p. 269-275, 1999.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa.CNPMS, 1995. 45 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 21).

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; MATOSO, M. J. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma***. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1999. 40 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 30)

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília, DF: Embrapa-CENARGEN, 1996. 204 p. (Embrapa-CENARGEN.Documentos, 20).

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 23, p. 409-442, 1978.

HAJEK, A. E.; ST LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 293-322, 1994.

LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.): **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 282-287.

NOUR, S. M.; CLEYET-MAREL, J. C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M. P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chick-peas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rizobium*

mediterraneum sp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 640-648, 1995.

OLIVEIRA, V. M.; COUTINHO, H. L. C.; SOBRAL, B. W. S.; GUIMARÃES, C. T.; van ELSAS, J. D.; MANFLIO, G. P. Discrimination of *rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, p. 137-141, 1999.

RIBA, G.; SILVY, C. **"Combattre les ravageurs des cultures. Enjeux et perspectives"** Paris: INRA, 1989.

VALICENTE, H. F.; CRUZ, I. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovirus**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1991. 23 p. (Embrapa-CNPMS.Circular Técnica, 15)

WAGNER, B. L.; LEWIS, L. C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3468-3473, 2000.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.): **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELICK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

Comunicado Técnico, 93

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: 0xx31 3779 1000
Fax: 0xx31 3779 1088
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Comitê de Publicações

Presidente: Jamilton Pereira dos Santos
Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães
Membros: Camilo de Lélis Teixeira de Andrade, Cláudia Teixeira Guimarães, Carlos Roberto Casela, José Carlos Cruz e Márcio Antônio Rezende Monteiro

Expediente

Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

1ª edição
1ª impressão (2004) Tiragem: 200