



**JAYARA DAYANY DA COSTA SILVA**

**MANEJO ECOLÓGICO DA CIGARRINHA DAS RAÍZES**  
***Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (HEMIPTERA:**  
**CERCOPIDAE) EM CANA-DE-AÇÚCAR**

**TERESINA – PI**

**2019**

**JAYARA DAYANY DA COSTA SILVA**

**MANEJO ECOLÓGICO DA CIGARRINHA DAS RAÍZES *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada a Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Agricultura Tropical para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Solange Maria de França

**TERESINA – PI**

**2019**

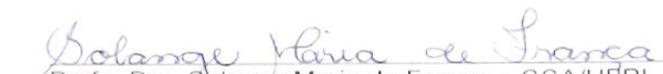
JAYARA DAYANY DA COSTA SILVA

**MANEJO ECOLÓGICO DA CIGARRINHA DAS RAÍZES *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada a Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Agricultura Tropical para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em: 25 de fevereiro de 2019

Comissão Julgadora:

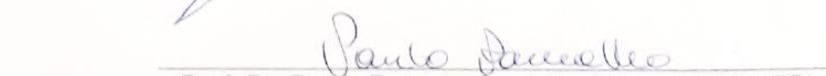
  
Prof. Dra. Dolange Maria de França – CCA/UFPI

  
Prof. Dra. Eulália Maria de Sousa Carvalho – CCA/UFPI

  
Prof. Dr. Maruzanete Pereira Melo - UFOPA

  
Prof. Dr. Gilson Soares da Silva – UEMA

  
Prof. Dr. Evandro Ferreira das Chagas – UEMA

  
Prof. Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva – CCA/UFPI  
(Orientador)

**TERESINA – PI**

**2019**

Aos meus pais,

Francisca das Chagas Costa e Silva e Antônio Lisboa Silva por todo o amor e ensinamentos a mim dedicados, que sempre estiveram presentes em todos os momentos, mas principalmente foram meu apoio nos mais difíceis.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pelas constantes chances de crescimento e aprimoramento espiritual e profissional, por facilitar o caminho que trilho ao pôr pessoas que contribuem para este crescimento e tornam minha jornada mais feliz.

À Universidade Federal do Piauí - UFPI e ao Programa de pós-graduação em Agronomia – Agricultura tropical, por ao longo de 12 anos, ter sido minha segunda casa e ter contribuído em minha formação profissional e pessoal.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES pela concessão da bolsa para realização da pesquisa.

Ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da UFPI pelo suporte de material, reagentes e logística de transporte para realização das coletas em campo.

Ao professor Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva, por suas preciosas orientações e por além de tudo ter sido um grande amigo durante toda essa jornada.

À minha grande coorientadora/amiga Dr.<sup>a</sup> Solange Maria de França, uma das mulheres mais fortes e corajosas que tive o prazer de conhecer, sua chegada foi um marco em minha vida acadêmica, não há como quantificar quanto aprendizado e crescimento sua presença me trouxeram.

Ao professor da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, amigo e também coorientador Dr. Maruzanete Pereira de Melo, por toda paciência, conhecimentos e tempo a mim dedicados.

Ao professor Dr. Francisco de Alcântara Neto - UFPI, por todo o suporte que deu ao nosso trabalho, por sua sincera amizade e por acreditar no meu potencial.

Ao grupo Olho d'água, ao Instituto Biológico de São Paulo, à Fazenda Agrosserra pela concessão dos isolados fúngicos utilizados nessa pesquisa.

A Dr.<sup>a</sup> Leila Luci Dinardo Miranda e Dr. Diego Olympio Peixoto Lopes do Instituto Agrônomo, Centro de Cana-de-açúcar, Ribeirão Preto-SP pela identificação das cigarrinhas.

A todos professores que colaboraram em várias etapas dessa pesquisa (Dr.<sup>a</sup> Kedma Silva Matos - UFRR, Dr. Ricardo Harakava - Instituto Biológico de São Paulo, Dr. Gilvan Ferreira da Silva – Embrapa Amazônia Ocidental) sem as quais, esta não seria possível.

À empresa de controle biológico Fitoagro, fazenda Agro-serra, Instituto Biológico de São Paulo e ao grupo Olho d'água pelos isolados de fungos cedidos a esta pesquisa.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI, por permitir que eu me dedicasse a conclusão desta pesquisa.

Ao Dr. Marcondes Araújo da Silva - IFPI, pelo auxílio nas etapas de conclusão desta pesquisa.

Aos meus pais, (Lisboa e Francisca) pelo amor e apoio, por terem acreditado em minha capacidade e por me ter dado forças para conquistar essa vitória.

Aos meus irmãos, que sempre me ajudaram quando necessário, em especial minha irmã Jardeani Samara que em momentos de grande dificuldade esteve lá para me apoiar.

A minha grande família, em especial Alexandra e Eloah, por toda a paciência, pela compreensão, por me ajudarem a aliviar a mente em cada momento de dificuldade passado.

Ao meu grande amigo Vicente Neto, por me dar segurança quando eu não me achava capaz de continuar.

As minhas amigas gatas, Janaína, Raquel, Glenda e Solange (novamente), por aliviarem o stress, por me dar motivos para rir e por me ajudar a ser sempre melhor.

Aos meus amigos Rodrigo, Claudyanne, Grazi, Adriana e Welder (integrantes do caça e pesca) João Pedro, Alison Alexandrino, Ana Roberta pelas conversas bobas que me trouxeram muitos risos e apoio nos momentos complicados.

Ao seu Vicente (*in memoriam*) por toda ajuda, gentilezas e risadas que provocava quando em vida.

A todos os colegas da pós-graduação, pelas colaborações e convívio harmonioso.

A toda a equipe do laboratório de Entomologia, em especial Mayara, José Claudio, Alana, Beatriz, Paulo, Letícia pela amizade, ajuda, apoio, momentos felizes, momentos de gordices e companheirismo a mim dedicados.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e me ajudaram na finalização de mais esta etapa na minha vida.

## RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes para o país, fortalecendo o agronegócio brasileiro com 16% de toda produção agrícola nacional e gerando empregos diretos e indiretos. Cigarrinhas do gênero *Mahanarva* apresentam-se como uma das principais pragas associadas a cana, provocando reduções significativas na produtividade e qualidade da cana. Este trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer as espécies de cigarrinha do gênero *Mahanarva* associadas à cana-de-açúcar no nordeste do Brasil, além de avaliar aspectos bioecológicos destas cigarrinhas e conhecer a filogenia de fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* utilizadas no controle destas espécies. Inicialmente, foram realizadas coletas de adultos de cigarrinhas em cultivos comerciais de cana-de-açúcar de diversos estados do Nordeste e procedeu-se sua identificação. Foram realizadas amostragens de ninfas e adultos de cigarrinhas em plantio comercial de cana-de-açúcar em União – PI (Comvap) por um período de 12 meses, além de avaliar a duração da diapausa e o desenvolvimento de ovos mantidos em câmara incubadora do tipo B.O.D. Paralelamente, foram obtidos sete isolados de fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* de diferentes estados brasileiros e de diferentes hospedeiros. Os isolados foram identificados pelo sequenciamento das regiões TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, RPB1 e RPB2. Para caracterização morfológica, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubadas em BOD 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 70-80% umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas luz. A partir de imagens obtidas com auxílio do microscópio óptico com câmera digital Tucsen acoplada e uso do software MicroMeasure, 3.3.0, procedeu-se a medição dos conídios. Para avaliar a patogenicidade, inoculou-se uma suspensão de conídios com concentração padronizada de 1,0 x 10<sup>9</sup> conídios/mL de *Metarhizium sp.* em ninfas de *Mahanarva sp.* A Cigarrinha *Mahanarva posticata* está presente nos canaviais dos estados de Alagoas e Pernambuco, *M. fimbriolata* foi encontrada nos canaviais de Alagoas e Maranhão, enquanto *M. spectabilis* foi registrada nos estados do Piauí e Maranhão. O pico populacional de ninfas de *M. spectabilis* ocorreu nos meses de junho de 2016, fevereiro e abril de 2017, a diapausa de ovos apresentou duração de 240 dias. A análise de consenso gerada a partir do alinhamento combinado das regiões TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, RPB1 e RPB2 agrupou os isolados em um clado distinto das demais espécies do complexo *Metarhizium anisopliae*. Os caracteres morfológicos são semelhantes aos apresentados pela espécie *M. anisopliae*. Todos os isolados foram patogênicos a *M. spectabilis*. É relatada a primeira ocorrência de *Mahanarva spectabilis* em canaviais no Piauí e Maranhão. O desenvolvimento embrionário de *M. spectabilis* apresenta quatro fases distintas, e seus ovos entram em diapausa na segunda fase de desenvolvimento. O sequenciamento das regiões do fator de alongação TEF-1  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, RPB1 e RPB2 permitiram identificação de uma nova espécie dentro do complexo *Metarhizium*, sendo que esta espécie, apresenta potencial para controle biológico da cigarrinha *M. spectabilis*.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos, cigarrinhas da cana-de-açúcar, *Metarhizium sp.*

## ABSTRACT

Sugarcane is one of the important crops for the country, strengthening Brazilian agribusiness with 16% of all national agricultural production and generating direct and indirect jobs. Spittlebugs of the genus *Mahanarva* are presented as major pests associated with sugarcane, causing large-scale reductions in sugarcane productivity and quality. This work was carried out with the objective of knowing the species of the *Mahanarva* spittlebug associated to sugarcane in the northeast of Brazil, as well as to evaluate the bioecological aspects of these spittlebugs and to know the phylogeny of entomopathogenic fungi of the genus *Metarhizium* used in the control of these species of spittlebugs. Initially, adult samples of spittlebugs were collected in commercial sugarcane crops in several Northeastern states and identified. Samples of nymphs and adults of spittlebugs were carried out in a commercial sugarcane plantation in União - PI (Comvap) for a period of 12 months, in addition to evaluating the duration of diapause and the development of eggs kept in a BOD incubator. In parallel, eight isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* were obtained from different Brazilian states and from different hosts. Isolates were identified by sequencing the TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin, RPB1 and RPB2 regions. For morphological characterization, the isolates were grown in petri dishes containing BDA and incubated in BOD  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70-80% relative humidity and 12 light photophase, from images obtained with the aid of the optical microscope with Tucsen digital camera coupled and using MicroMeasure software, 3.3.0, the conidia was measured. For pathogenicity, a suspension of conidia with a standardized concentration of  $1.0 \times 10^9$  conidia / mL of *Metarhizium* sp. in nymphs of *Mahanarva* sp. for pathogenicity evaluation. The spittlebugs *Mahanarva posticata* is present in the cane fields of the states of Alagoas and Pernambuco, *Mahanarva fimbriolata* was found in the sugarcane fields of Alagoas and Maranhão, and *M. spectabilis* was recorded in the states of Piauí and Maranhão. The population peak of *M. spectabilis* nymphs occurred in June 2016, February and April 2017, the diapause of eggs of this spittlebug presented duration of 240 days. The consensus analysis generated from the combined alignment of the TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin, RPB1 and RPB2 regions grouped the isolates into a distinct clade of the other species of the *Metarhizium anisopliae* complex. The morphological characters are similar to those presented by *M. anisopliae* species. All isolates were pathogenic to *M. spectabilis*. The first occurrence of *Mahanarva spectabilis* in cane fields in Piauí and Maranhão is reported. The embryonic development of *M. spectabilis* presents four distinct phases, and its eggs enter diapause in the second stage of development. The sequencing of the TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin, RPB1 and RPB2 elongation factor regions allowed identification of a new species within the *Metarhizium* complex, and this species has potential for biological control of the spittlebugs *M. spectabilis*.

Key words: Entomopathogenic fungi, sugarcane Spittlebugs, *Metarhizium* sp.

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

**Tabela 1** Espécies de cigarrinhas coletadas em canaviais do Nordeste, Brasil.....38

### CAPITULO II

**Tabela 1** Correlação linear simples entre os fatores abióticos e a infestação de *Mahanarva spectabilis* em cana-de-açúcar. União, Piauí (2017) .....50

**Tabela 2** Médias de comprimento e largura em milímetros de ovos de *M. spectabilis* durante as fases de desenvolvimento embrionário.....54

### CAPITULO III

**Tabela 1** Isolados de *Metarhizium* sp. testados para o controle de *M. spectabilis* ....64

**Tabela 2** L Espécies de isolados de *Metarhizium* spp. utilizados na análise filogenética com seus respectivos hospedeiros, país de origem e Código e números de acesso no GenBank.. ..... 67

**Tabela 3** Comprimento e largura (valores máximos, mínimos e médias) de conídios de isolados de *Metarhizium* sp. crescidos em BDA a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 70-80% umidade relativa e fotofase de 12 horas em Teresina, PI.....74

**Tabela 4** Mortalidade confirmada, corrigida e tempo letal médio de diferentes isolados de *Metarhizium* sp. sobre ninfas de *M. spectabilis*. .....74

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> Ovos (A); Espuma (B); Ninfas (C) e adultos (D) de <i>M. spectabilis</i> em cana-de-açúcar. ....  | 18 |
| <b>CAPITULO I</b>  |    |
| <b>Figura 1</b> Padrão de coloração de asas exibido por <i>M. spectabilis</i> coletada em cana-de-açúcar. ....   | 40 |
| <b>Figura 2</b> A: Genitália de macho de <i>M. fimbriolata</i> ; B: Genitália de macho de <i>M. spectabilis</i> . ....   | 40 |
| <b>CAPITULO II</b>   |    |
| <b>Figura 1</b> Relação entre ninfas e adultos de <i>M. spectabilis</i> e elementos climáticos em cana-de-açúcar em União, Piauí, nos meses de junho de 2016 a junho de 2017. ...  | 50 |
| <b>Figura 2</b> Fases do período embrionário de <i>Mahanarva spectabilis</i> : A- fase 1; B e C – fase 2; D e E – fase 3; F e G – fase 4. ....   | 52 |
| <b>Figura 3</b> Ovos de <i>Mahanarva spectabilis</i> em diapausa 12 dias após a postura.....   | 53 |
| <b>CAPITULO III</b>  |    |
| <b>Figura 1</b> Análise filogenética inferência Bayesiana, concatenada com dados que inclui as sequências do fator de alongação EF-1, $\beta$ -tubulina, RPB1 e RPB2 de isolados do complexo <i>Metarhizium anisopliae</i> . Valores do suporte estatísticos indicados acima dos internódios. ....                         | 70 |
| <b>Figura 2</b> Colônias de <i>Metarhizium</i> sp.: A -JD01; B - JD02; C-JD04; D-JD05; E-JD13; F-JD21 (IBCB425); G-JD22(IBCD 348), H-Cadeia de conídios e I-septos em hifas de <i>Metarhizium</i> sp.; Conídios de <i>Metarhizium</i> sp.; J-JD01; K-JD02; L-JD04; M-JD05; N-JD13; O-JD21(IBCB425); P-JD22 (IBCB348). .... | 73 |

## SUMÁRIO

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | RESUMO.....  | vi   |
|        | ABSTRACT .....   | vii  |
|        | LISTA DE TABELAS .....   | viii |
|        | LISTA DE FIGURAS.....  | ix   |
| 1.     | INTRODUÇÃO GERAL .....   | 12   |
| 2.     | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 15   |
| 2.1    | A Cultura da cana-de-açúcar.....   | 15   |
| 2.1.1  | Origem e distribuição geográfica.....  | 15   |
| 2.1.2  | Importância econômica .....  | 15   |
| 2.1.3  | Insetos praga associados à cana-de-açúcar.....   | 16   |
| 2.2    | Cercopídeos .....  | 17   |
| 2.2.1  | Medidas de controle de <i>M. spectabilis</i> .....   | 19   |
| 2.3.   | Fungos entomopatogênicos .....   | 20   |
| 2.3.1. | <i>Metarhizium anisopliae</i> .....  | 21   |
|        | REFERÊNCIAS .....  | 24   |
| 3      | CAPITULO I .....   | 34   |
|        | Cigarrinhas da cana-de-açúcar no Nordeste brasileiro. ....                                       | 34   |
|        | RESUMO.....  | 35   |
|        | REFERÊNCIAS .....  | 41   |
| 4      | CAPITULO II .....  | 43   |
|        | Aspectos bioecológicos de <i>Mahanarva spectabilis</i> (Stål, 1854) (Hemiptera:<br>Cercopidae)43 |      |
| 4.1    | INTRODUÇÃO .....   | 46   |
| 4.2    | MATERIAL E MÉTODOS .....   | 47   |
| 4.3    | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 49   |
| 4.3    | CONCLUSÕES .....   | 54   |

|         |   |    |
|---------|---|----|
|         | REFERÊNCIAS .....   | 54 |
| 5       | CAPITULO III .....  | 58 |
|         | Caracterização de uma nova linhagem do complexo <i>Metarhizium anisopliae</i><br>58 |    |
|         | RESUMO .....  | 59 |
|         | ABSTRACT .....  | 60 |
| 5.1     | INTRODUÇÃO .....  | 61 |
| 5.2     | MATERIAL E MÉTODOS .....  | 63 |
| 5.2.1   | Caracterização morfológica e filogenética de isolados de <i>M. anisopliae</i> ....  | 63 |
| 5.2.1.1 | Obtenção dos isolados .....   | 63 |
| 5.2.1.2 | Caracterização morfológica .....  | 64 |
| 5.2.1.3 | Extração de DNA, PCR e sequenciamento .....   | 65 |
| 5.2.1.4 | Alinhamento e análise filogenética .....  | 66 |
| 5.2.3   | Testes de Patogenicidade .....  | 68 |
| 5.2.3.1 | Obtenção e criação de <i>M. spectabilis</i> .....                                   | 68 |
| 5.2.3.2 | Bioensaio de Patogenicidade .....   | 68 |
| 5.3     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 69 |
| 5.3.1   | Análises filogenéticas .....  | 69 |
| 5.3.2   | Avaliação morfológica .....   | 72 |
| 5.3.3   | Teste de patogenicidade .....   | 74 |
| 5.4     | CONCLUSÕES .....  | 75 |
|         | REFERÊNCIAS .....   | 76 |
|         | ANEXO I .....   | 83 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L. 1753) é umas das culturas mais importantes para o Brasil. Cultivada em todas as regiões, é uma das responsáveis por mover o agronegócio brasileiro, representando 16% de toda a produção agrícola nacional com mais de 8 milhões de hectares ocupados no país (CONAB, 2018; IBGE, 2016). Utilizada tradicionalmente para a produção de açúcar, nas últimas décadas, em razão do aumento na demanda mundial por combustíveis renováveis, a cana vem sendo utilizada como matéria prima na produção de etanol, biocombustível alternativo de baixo custo e baixo potencial poluente, que adquiriu grande importância no cenário nacional.

Várias fatores de estresse bióticos ou abióticos, podem causar reduções em grande escala na produtividade e qualidade da cana-de-açúcar produzida. Nesse sentido, as cigarrinhas da família Cercopidae em especial o gênero *Mahanarva* assumem especial destaque.

Ninfas e adultos destas cigarrinhas causam injúrias ao se alimentar da seiva da cana-de-açúcar, onde, por ocasião, injetam toxinas que causam necrose no tecido foliar e radicular das plantas que resultam em uma desordem fisiológica. Os adultos destas cigarrinhas alimentam-se nas folhas, enquanto que as ninfas de *Mahanarva* spp., dependendo da espécie, podem alimentar-se no sistema radicular ou na parte aérea das plantas, que, são facilmente identificadas no campo por apresentarem o corpo recoberto por uma espuma branca por elas produzida. Em resposta a esses ataques, a cana apresentará encurtamento, murchamento e rachadura de colmos, morte de perfilhos e surgimento de brotações laterais, além de redução na quantidade e qualidade do açúcar recuperável e aumento no teor de fibras.

No Brasil, existem registros de quatro espécies de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* atacando cana-de-açúcar: *Mahanarva fimbriolata* (Stål 1854), a cigarrinha-das-raízes; *Mahanarva posticata* (Stål, 1855), a cigarrinha-das-folhas, consideradas as mais importantes para a cultura; *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909), a cigarrinha das pastagens e *Mahanarva liturata* (Le Peletier and Serville, 1825) com poucos dados a respeito de sua distribuição, biologia e danos que provocam à cultura.

A infestação e dinâmica populacional de cigarrinhas no campo são fortemente influenciados pelas condições climáticas locais. Umidade relativa, temperatura e precipitação são os elementos que apresentam maior influência sobre *Mahanarva* spp., sendo a umidade um fator limitante ao seu desenvolvimento, razão dos picos populacionais nos meses mais úmidos e quentes do ano, em geral, dependendo destes elementos, podem se desenvolver de três a quatro gerações de cigarrinhas por ano.

O ciclo biológico de *Mahanarva* spp. se completa num período que pode variar de dois a três meses. Os adultos deste gênero, ao final do período chuvoso, realizam a postura de ovos que são induzidos a entrar em diapausa, mecanismo que confere a capacidade ao organismo de transpor períodos de adversidade, cuja duração, ainda não está bem estabelecida, eclodindo somente na próxima estação chuvosa, iniciando um novo ciclo de cigarrinhas no campo.

Como método de controle, o uso de inseticidas sistêmicos tem sido largamente utilizado, no entanto, o controle biológico com a utilização de fungos entomopatogênicos tem despontado como alternativa viável, apresentando as vantagens de baixo custo, eficiência e ecologicamente seguro. *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin é o fungo entomopatogênico mais utilizado no controle de cigarrinhas no Brasil. Este fungo apresenta uma grande diversidade genética e variabilidade intraespecífica, que podem influenciar diretamente nos níveis de mortalidade que causam. Observa-se um grande número de trabalhos que avaliam diferentes isolados de *M. anisopliae* no controle de *M. fimbriolata*, principalmente em área de ocorrência natural do fungo, no entanto, nem sempre o isolado local é o mais indicado para utilização em controle biológico (MACEDO; ALVES; VIEIRA, 2006).

Para o manejo de áreas infestadas por *Mahanarva* spp. deve-se considerar a utilização de vários métodos de controle que combinados com informações sobre sua bioecologia, aumentarão as chances de sucesso no controle. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer as espécies de cigarrinha do gênero *Mahanarva* associadas à cana-de-açúcar no nordeste do Brasil, além de avaliar aspectos bioecológicos destas espécies e conhecer a filogenia de fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* utilizadas no controle destas espécies de cigarrinhas.

## REFERÊNCIAS

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Cana-de-Açúcar:** Quarto Levantamento Safra 2017/18. CONAB, 2018. Disponível em: < [https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/17026\\_e0504d08aca77ee13e86c2e7e7f43424](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/17026_e0504d08aca77ee13e86c2e7e7f43424)>. Acesso em 23 dez. 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes.** IBGE, 2016. Disponível em < [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2016\\_v43\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2016_v43_br.pdf) >. Acesso em 30 nov. 2017.

MACEDO, D.; ALVES, S. B.; VIEIRA, S. A.. Screening of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains against *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854)(Hemiptera: Cercopidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 1, p. 47-52, 2006.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 A Cultura da cana-de-açúcar**

#### **2.1.1 Origem e distribuição geográfica**

A cana-de-açúcar é uma planta semi-perene que pertence à família Poacea, gênero *Saccharum*, abrangendo várias espécies cultivadas no Brasil e no mundo (LUCCHESI, 2001; DE MORAIS et al., 2015).

A origem do complexo de espécies deste gênero é atribuída ao Norte da África e Ásia, embora não exista um consenso quanto ao país de origem (DE OLIVEIRA; MENDES, 2008). Essa cultura chegou ao Brasil logo após o descobrimento, onde ganhou importância econômica com a construção dos engenhos em Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe e Paraíba, durante metade do século XVI. A partir daí a cultura foi expandida para outros estados do nordeste brasileiro, bem como para estados das regiões norte e sudeste do país (CANABRAVA, 2005).

#### **2.1.2 Importância econômica**

A cana-de-açúcar é uma cultura de expressiva importância econômica e social para o Brasil, que assume a posição de maior produtor mundial desta cultura. Na safra 2017/2018 o país registrou uma área de 8,7 milhões de hectares plantados, com uma produção total de 633,26 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (CONAB, 2018).

Ranqueando o valor de produção das principais culturas no Brasil, a cana-de-açúcar se destaca como a segunda cultura de maior valor econômico, perdendo apenas para soja. É cultivada em todas as regiões do país, mas sua produção se concentra na região Sudeste, tendo São Paulo como principal produtor nacional, que, em 2014, foi responsável por 57,5% do total produzido no Brasil (IBGE, 2017). Goiás é segundo maior produtor nacional, seguido por Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e Mato Grosso. O Piauí, juntamente com os outros estados produtores respondem por 8,7% da produção nacional (IBGE, 2017)

A cana-de-açúcar é matéria prima para produção de açúcar e etanol, tendo como principal subproduto o bagaço da cana, utilizado na alimentação animal. Além disso, a cana é utilizada na produção de bebidas (cachaça, caldo de cana, rum), rapadura, fibras, papel, plástico e fertilizantes. Todas essas atividades do setor canavieiro geram

aproximadamente 1.000.000 de empregos diretos e 4.000.000 de empregos indiretos (EZEQUIEL et al., 2006; MARTINELLI; SPERS; COSTA, 2000; ÚNICA, 2004).

### 2.1.3 Insetos praga associados à cana-de-açúcar

Os insetos praga são considerados um dos fatores que afetam diretamente a produtividade da cultura da cana-de-açúcar. As ordens Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera constituem-se como as mais representativas em número de espécies pragas (ALMEIDA et al., 2007; DINARDO-MIRANDA, 2010; LOPES; DINARDO-MIRANDA; BUSOLI, 2011; DINARDO-MIRANDA; FRACASSO, 2009; GARCIA; BOTELHO; PARRA, 2006; MORAES; AVILA, 2014).

No Brasil as perdas ocasionadas por insetos em cana-de-açúcar giram em torno de 10% do total produzido, onerando as perdas econômicas devido ao aumento de custos relacionados ao controle desses insetos, que estão em torno de 260 mil dólares por ano em inseticidas (OLIVEIRA et al., 2014).

As espécies *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) são duas importantes pragas da cultura. Estes insetos, cujas formas jovens são lagartas conhecidas como brocas, ocasionam injúrias na cana-de-açúcar que, ao penetrar nos colmos formam galerias onde irão se alimentar e se desenvolver, resultando em perda de peso, encurtamento de entrenós, morte da gema apical, além de facilitar a entrada de patógenos que causam podridões, que resultarão na perda de sacarose (GONZÁLES, 2003; MACEDO; MACEDO, 2004).

*Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) é outra praga importante encontrada com frequência em cultivos de cana-de-açúcar do estado de São Paulo. Conhecido como bicudo-da-cana-de-açúcar, as larvas são responsáveis por provocar as injúrias à cultura. Estas brocam as raízes e os colmos da cana-de-açúcar e, em consequência, ocorre o amarelecimento das folhas com posterior morte de perfilhos (DINARDO-MIRANDA, 2005; DINARDO-MIRANDA; FRACASSO, 2010).

Os cupins também estão associados aos canaviais brasileiros ocasionando prejuízos. São conhecidas 12 espécies pertencentes aos gêneros *Heterotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae), *Procornitermes* (Isoptera: Termitidae) e *Neocapritermes* (Isoptera: Termitidae) (MOREIRA, 2004). Ainda pode-se destacar como pragas as formigas cortadeiras, dos gêneros *Atta* (ALMEIDA, 2006) e *Acromyrmex* (DINARDO-MIRANDA, 2010), lagarta elasmó (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller, 1982)

(Lepidoptera: Pyralidae), o besouro *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Cerambycidae) (NUNES-JÚNIOR, 1996) e o pulgão *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae) (SANGUINO, 2012).

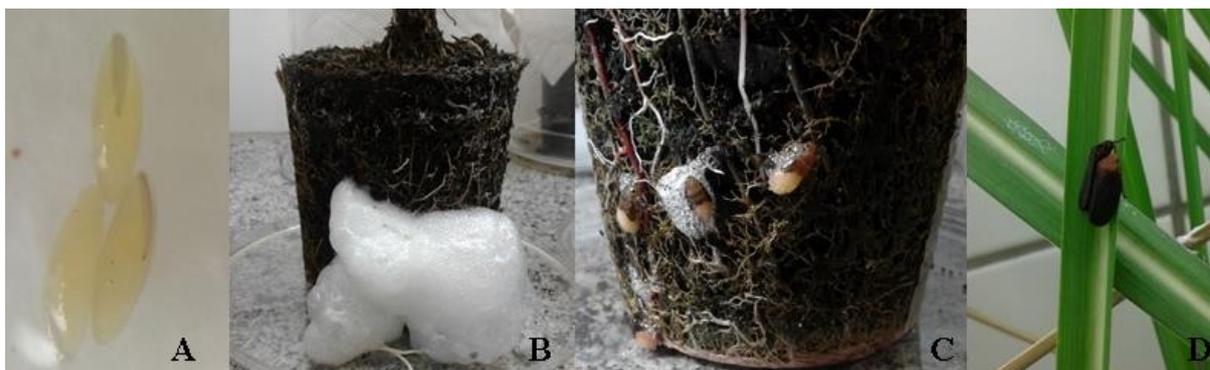
As cigarrinhas *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) e *Mahanarva posticata* (Stål, 1855) (Hemiptera: Cercopidae), conhecidas como cigarrinha das raízes e cigarrinha das folhas são pragas chave da cana-de-açúcar, entretanto, outras espécies são associadas a cana-de-açúcar como *Mahanarva rubicunda indentata* (Walker, 1858) (CHAVES et al., 2014), *Mahanarva andígena* (Jacob, 1908) (FORS, 2000), *Mahanarva bipars* (Walker, 1858) (PECK et al., 2004) e mais recentemente *Mahanarva liturata* (Le Peletier de Saint-Fargeau & Serville, 1825) e *M. spectabilis* (ALVES; CARVALHO, 2014) têm sido relatadas em extensas áreas de canaviais brasileiros. Estas cigarrinhas ocasionam injúrias ao sugarem a seiva das plantas, diretamente nas raízes ou das folhas. As ninfas dessas espécies produzem uma espuma branca característica, que exerce a função de proteção contra agentes externos. O ataque das ninfas e dos adultos provocam morte das raízes, comprometimento do transporte de água e nutrientes pela planta, queima das folhas com conseqüente redução na fotossíntese, que resultarão em perdas significativas tanto em produtividade, quanto na qualidade tecnológica da matéria prima (DINARDO-MIRANDA, 2005; GARCIA et al., 2007; MADALENO et al., 2008; MARQUES; LIMA; OLIVEIRA, 2009).

## 2.2 Cercopídeos

Os cercopídeos são insetos sugadores cuja origem é atribuída à região neotropical do planeta, desde o México na América do Norte e América Central. Conhecidos popularmente como cigarrinhas, apresentam desenvolvimento por hemimetabolia, com ciclo biológico composto pelas fases de ovos, ninfas e adultos e são associados predominantemente a gramíneas como cana-de-açúcar, capim elefante e capim braquiária (AUAD et al., 2007; GARCIA; BOTELHO; PARRA, 2006; MENDONÇA; FLORES; SÁENZ, 2005).

Esses insetos possuem grande capacidade reprodutiva, *M. fimbriolata* e *Notozulia entreriana* (Berg, 1879), por exemplo, tem médias registradas de 340 e 100 ovos por fêmea, respectivamente (GARCIA; BOTELHO; PARRA, 2006; RAMOS, 1976). Os ovos dos cercopídeos assemelham-se a grãos de arroz (Figura 1A), sendo alongados e de coloração variando de branco a amarelo-pálido que, dependendo da fase de

desenvolvimento, apresentam tendência de entrar em períodos de pausa, conhecidos como diapausa, a qual ocorre normalmente em época de déficit hídrico (seca). Essa diapausa permite que as gerações consigam ultrapassar esse período de adversidade, dando condições que os cercopídeos ressurgam quando as condições se tornem adequadas ao seu desenvolvimento (CASTRO et al., 2005; MORALES, 1993; VALERIO et al., 2013).



**Figura 1** Ovos (A); Espuma (B); Ninfas (C) e adultos (D) de *M. spectabilis* em cana-de-açúcar.

As ninfas dos cercopídeos passam por cinco ínstares, e alimentam-se da seiva bruta de raízes ou do caule na base da planta ao nível do solo. Durante esse estágio as ninfas ficam envolvidas numa espuma branca e espessa (Figura 1B e C), produzidas por glândulas localizadas no seu abdome, conhecidas como glândulas de Batelli, cuja função é proteção contra o ressecamento ou contra o ataque de inimigos naturais (GUAGLIUMI, 1972; ZUCCHI; SILVEIRA NETO; NAKANO, 1993). As desordens fisiológicas oriundas do ataque destes insetos causam morte de raízes e amarelecimento das plantas, resultando em colmos mais finos, curtos e enrugados (GARCIA et al., 2007; HOLMANN; PECK, 2002; MACEDO; MACEDO, 2004; MADALENO et al., 2008).

Os adultos vivem na parte aérea da cana, onde alimentam-se diretamente nas folhas, apresentam pernas posteriores do tipo saltatórias, sendo estas utilizadas para deslocamento dentro do canavial (Figura 1D). O vôo em geral é de curta distância e está relacionado com a dispersão da espécie (GUAGLIUMI, 1972). Os adultos das cigarrinhas causam danos mais severos que as ninfas, pois durante a sucção da seiva injetam toxinas que provocam reduções do teor de clorofila que acarretarão na perda da capacidade fotossintética da planta, causando lesões necróticas que se espalham do ápice para a base da folha (LÓFEZ et al., 2009)

Várias espécies de cercopídeos têm sido consideradas pragas em pastagens ou cultivo de cana-de-açúcar. *Deois incompleta* (Walker, 1851), *Deois flavopicta* (Stal, 1954), *Notozulia entreriana* (Berg, 1879), *Aeneolamia selecta* (Walker, 1858) e *M. spectabilis* são tradicionalmente associadas a pastagens, enquanto que as espécies *M. posticata*, *M. fimbriolata*, *M. rubicunda indentata*, *M. andigena*, *M. bipars*, *M. liturata* e mais recentemente *M. spectabilis* estão associadas a cana-de-açúcar (ALVES; CARVALHO, 2014; DINARDO-MIRANDA, 2008; FORS, 2000; PECK et al., 2004; PIRES; PRICE; OLIVEIRA, 2000; VALERIO, 2009; VALERIO et al., 2013).

*Mahanarva spectabilis* é considerada uma praga limitante à produção de pastagens estabelecidas com gramíneas, sem relatos de danos em cana-de-açúcar (AUAD; CARVALHO, 2009). Pastagens expostas a adultos desta cigarrinha exibem uma redução do teor de clorofila afetando a capacidade fotossintética nos tecidos foliares atacados (RESENDE; AUAD; FONSECA, 2014). Altas perdas funcionais, redução de palatabilidade e consequente aceitação pelos animais foram registradas em *Brachiaria ruziziensis* (Germain & Edvard) atacadas por adultos de *M. spectabilis* (RESENDE et al., 2012). Em capim elefante, altas infestações desta cigarrinha podem levar a planta a morte (AUAD et al., 2007)

*Mahanarva spectabilis* é uma cigarrinha que ocorre apenas no Brasil e na Bolívia. Inicialmente foi registrada em cana-de-açúcar no Brasil, no município de Goianésia (GO) (ALVES; CARVALHO, 2014). A sua ocorrência expandiu-se até canaviais na região Centro-Sul do Brasil, onde ocorria com outras cigarrinhas como *M. fimbriolata* que apareciam em apenas 4% das amostras, enquanto *M. spectabilis* estava presente em 34% destas (DINARDO-MIRANDA et al., 2014).

*Mahanarva spectabilis* apresenta padrão de coloração alar e tamanho corporal muito similar ao apresentado por *M. fimbriolata*. Devido estas semelhanças nos caracteres morfológicos, sujeitos a plasticidade fenotípica, suspeita-se que existam equívocos na distinção entre estas espécies, indicando a necessidade de identificação precisa através da análise morfológica da genitália do macho feita por especialistas ou a identificação feita através da utilização de marcadores moleculares (ALVES; CARVALHO, 2014; AUAD et al., 2010; MENDONÇA; FLORES; SÁENZ, 2005; PAULA-MORAES et al., 2008; SOULIER-PERKINS, 2018).

### **2.2.1 Medidas de controle de *M. spectabilis***

O monitoramento é primeira medida que deve ser tomada para que se escolha a estratégia de controle mais eficiente para a praga, o qual deve ser iniciado logo após o começo do período chuvoso e continuado durante toda a infestação, para que se acompanhe a evolução da população da praga no campo (MENDONÇA, 1996).

O controle cultural por meio do uso de variedades resistentes tem sido o método mais utilizado para redução da densidade populacional de *M. spectabilis*. Este método apresenta como vantagem o baixo custo de implantação associado a boa qualidade da forrageira sem prejuízos ao meio ambiente (AGUIRRE et al., 2012; SOBRINHO et al., 2010). Várias espécies de gramíneas têm sido avaliadas quanto aos mecanismos de resistência que apresentam. Capim elefante Roxo e Pioneiro (*Pennisetum purpureum* Schum), capim Tanzânia e Makueni (*Panicum maximum* Jacq.), *Brachiaria brizantha* Hochst. tem apresentando resistência do tipo antibiose (AUAD et al., 2007; SILVA et al., 2017). Entretanto, não se tem relato a luz da literatura de métodos de controle para essa espécie de cigarrinha em cana-de-açúcar.

Os fungos entomopatogênicos, embora apresentem-se como alternativa efetiva na supressão de diversas espécies de insetos pragas e com virulência comprovada a *M. spectabilis* não têm sido utilizados no manejo desta praga (CAMPAGNANI et al., 2017).

### 2.3. Fungos entomopatogênicos

São conhecidas aproximadamente 1000 espécies de fungos entomopatogênicos ao redor mundo (ST LEGER; WANG, 2010). *Beaveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Driver & Milner), *Isaria fumosorosea* (Wize), *Nomuraea rileyi* (Farl.) Samson e *Lecanicillium* sp. são as mais utilizadas para formulações comerciais de micoinsetidas no mundo (DE FARIA; WRAIGHT, 2007). *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Nomurae rileyi* (Farl.) Samson, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith embora menos utilizadas também são consideradas como importantes agentes de controle biológico de insetos (AGUS et al., 2015; DA COSTA et al., 2015; WAKIL et al., 2013; WRAIGHT et al., 2000).

O solo é considerado o ambiente natural destes fungos, onde são depositados seus esporos e onde estes permanecem durante determinado período do seu ciclo. Fatores como localização geográfica, clima, altitude, tipos de solo, pH, presença de matéria orgânica no solo influenciam a presença de espécies de fungos entomopatogênicos

(MEDO; CAGÁN, 2011; MEYLING; EILENBERG, 2007). Epizootias naturais também favorecem a manutenção e permanência dessas espécies nos ecossistemas (BAPTISTUSSI; MARGARIDO; CASTILHO, 2011; MENDONÇA; MENDONÇA, 2005).

*Metarhizium anisopliae* e *B. bassiana* têm sido constantemente isolados tanto de solos cultivados quanto de solos naturais (QUESADA-MORAGA et al., 2007; SUN; LIU, 2008). Dentre os métodos mais utilizados para isolamento de fungos destacam-se o método de suspensão seriada do solo e o método inseto-isca. O método inseto-isca, conhecido por sua eficácia na recuperação e estudos de biodiversidade de fungos entomopatogênicos, utiliza larvas de coleópteros do gênero *Tenebrio* ou lepidópteros do gênero *Galleria* que são confinadas em potes contendo amostras de solo, facilitando o processo de contato esporo e inseto que resultará na morte do hospedeiro, possibilitando assim o isolamento do fungo do solo (QUESADA-MORAGA et al., 2007; MEYLING; EILENBERG, 2006; STEINWENDER et al., 2014). O método de suspensão seriada do solo é realizado a partir de uma mistura homogeneizada de solo e água destilada esterilizada, que serão diluídas em determinadas concentrações e espalhadas em placas de Petri contendo meios de culturas seletivos ou não. Estas placas permanecerão incubadas em ambientes com temperatura, luminosidade e fotoperíodo controlados até que o período de esporulação das colônias, para posterior identificação dos fungos (ALVES et al., 1998; DA SILVA et al., 2011)

### **2.3.1. *Metarhizium anisopliae***

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 foi identificado pela primeira vez em 1879, por Metschnikoff infectando um coleóptero da família Scarabaeidae, espécie *Anisoplia austriaca* (Herbert, 1783), uma importante praga de trigo na Rússia (ZIMMERMANN, 1993). Classificado inicialmente como *Entomophthora anisopliae*, após revisão feita por Sorokin (1883), a espécie foi inserida no Filo Ascomycota; Classe Sordariomycetes; Ordem Hypocreales; Família Clavicipitaceae; Gênero *Metarhizium*, Espécie *Metarhizium anisopliae* (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; TULLOCH, 1976).

*Metarhizium anisopliae* apresenta conídios uninucleados, cilíndricos, hialinos ou com coloração fraca, mais estreitos na parte central. Estes crescem em colunas compactas, sobre conidióforos simples ou sobre ramificações compostas de um conjunto de micélio. As fiálides clavadas ou cilíndricas são originárias do vértice de hifas e se colocam uma ao lado da outra (ALVES, 1998).

Este fungo tem sido amplamente empregado no controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar (LOUREIRO et al., 2012). No Brasil, vem sendo utilizado desde 1975 no controle de *M. posticata* em canaviais da região Nordeste (ALVES, 1998), deste então, vários estudos têm sido feitos na busca de isolados que sejam virulentos às mais diversas pragas no Brasil, como a cigarrinha-das-raízes (*M. fimbriolata*), Cascudinho (*Alphitobius diaperinus* Panzer, 1797, Coleoptera: Tenebrionidae), formigas (*Atta sexdens sexdens* Linneaus, 1758, Hymenoptera: Formicidae), Broca gigante da cana-de-açúcar (*Castnia licus* Drury, 1773, Lepidoptera: Castniidae) (LOUREIRO et al., 2005; LOUREIRO; MONTEIRO, 2004; RODHE et al., 2006;).

A infecção que *M. anisopliae* causa no inseto se inicia a partir da adesão e germinação dos conídios em sua cutícula. Essa fase pode levar entre 16 e 20 horas e precisa de condições favoráveis de umidade e temperatura. Durante esse período ocorre a formação do tubo germinativo, de onde surgirá uma dilatação em sua extremidade chamada de apressório. Na parte inferior do apressório é formada uma saliência conhecida como grampo de penetração responsável por penetrar na epicutícula e procutícula do inseto. A penetração pode ocorrer devido à pressão da hifa sobre o tegumento dos insetos (penetração física) e através de produção de enzimas que irão facilitar a penetração (penetração química). Ainda pode ocorrer por via oral (através da boca, ânus) e regiões intersegmentais (ALVES, 1998).

A partir da penetração, inicia-se o processo de colonização do hospedeiro. As hifas que penetraram sofrerão um engrossamento e se ramificarão inicialmente no tegumento do inseto, depois seguem para a cavidade geral do corpo e, a partir daí o corpo é colonizado na seguinte ordem: corpos gordurosos, sistema digestivo e tubos de Malpighi, hipoderme e sistema nervoso, músculos e traqueias. O tempo de colonização pode variar de 76 a 120 horas. Durante o processo de infecção *Metarhizium* produz metabólitos secundários que apresentam atividade inseticida que irão matar o hospedeiro em conjunto com os danos físicos decorrentes do crescimento do micélio. Após 48 a 60 horas da morte do hospedeiro, hifas irão emergir do corpo, de onde ocorre a reprodução do fungo, através da produção de novos conídios que poderão ser disseminados e infectar novos indivíduos (ALVES, 1998; SMALL; BIDOCHKA, 2005).

A classificação taxonômica desse fungo, até então, era feita embasada em características morfológicas, como estruturas de esporulação (disposição das fiáides), tamanho, forma e cor dos conídios e coloração do micélio (JOHNSTON,

1915). Inicialmente, com base nestes caracteres, foram aceitas as espécies *M. anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal 1973, e dentro de *M. anisopliae* as variedades *anisopliae* e *major*, diferenciadas pelo tamanho dos conídios (TULLOCH, 1976). Após revisão, houve a adição das espécies *Metarhizium brunneum* Petch, 1935 e *Metarhizium album* Petch, 1931. No entanto, após um reexame, *M. brunneum* foi considerado sinônimo de *M. anisopliae*. Novas espécies foram sendo descritas ao redor do mundo, como *Metarhizium cylindrosporum* Chen & Guo, 1986, *Metarhizium pinghaense* Chen & Guo, 1986 e *Metarhizium guizhouense* Chen & Guo, 1986, e dentre estas espécies, algumas espécies crípticas, logo, ficou clara a limitação da identificação de espécies a partir de caracteres morfológicos (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2006; GUO HAI-LI et al., 1986).

Como complementação à identificação com base em caracteres morfológicos e facilitando a elucidação dos conflitos taxonômicos existentes foram acrescentados estudos em biologia molecular como análise filogenética obtida através do sequenciamento do DNA ribossomal (CURRAN et al., 1994) e rRNA 28s (RAKOTONIRAINY et al., 1994), da utilização dos marcadores moleculares das regiões ITS – espaçador transcrito interno, Beta-tubulina ( $\beta$ -tubulin) e Fator de alongação (EF-1 $\alpha$ ) que se mostraram eficientes para discriminar espécies crípticas dentro de *Metarhizium*. Outros marcadores também podem ser utilizados para detectar as variações genéticas entre espécies, como subunidades de RNA polimerase – RPB1 e RPB2, RAPD (Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso) e SSR (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009; DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, et al., 2016; BECERRA VELÁSQUEZ et al., 2007).

O sequenciamento da região ITS provou ser útil para separação de algumas espécies, no entanto, essa região não dá suporte para distinção de espécies crípticas, pela falta de resolução apresentada por esta (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2006). Para resolver tais problemas, a utilização de análises filogenéticas inferidas no sequenciamento e várias regiões do DNA, abordagem multigênica, têm apresentado resultados mais sensíveis e confiáveis para identificação de linhagens de *Metarhizium* (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009).

Este é um gênero muito diverso, com um amplo banco de dados de espécies no *Index Fungorum*, um banco de dados *online* sobre fungos que possui uma lista de 78 entradas para o gênero (CROUS et al., 2004). Novas espécies têm sido constantemente acrescentadas a esta lista, tendo como critério para reconhecimento

análise filogenética multigênica combinada a análises morfológicas (LOPES et al., 2018; ROCHA et al., 2013; REZENDE et al., 2015;

Toda esta variabilidade genética está diretamente relacionada com os níveis de patogenicidade apresentados por isolados de *M. anisopliae* (LOUREIRO et al., 2005; RODHE et al., 2006). Diferentes isolados de *M. anisopliae* ocasionaram mortalidade de *M. fimbriolata* que variaram entre 22 a 70% (FREITAS et al., 2012), outros trabalhos confirmam essa diferença na mortalidade de *M. fimbriolata* de acordo com os isolados de *Metarhizium*, que pode variar entre 10,5 a 60% (MACEDO; ALVES; VIEIRA, 2006). Portanto, esse é mais um fato que ressalta a importância de estudos de caracterização genética e morfológica de isolados deste gênero.

## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, L. M.; CARDONA, C.; MILES, J. W.; SOTELO, G. Characterization of resistance to adult spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) in *Brachiaria* spp. **Journal of economic entomology**, v. 106, n. 4, p. 1871-1877, 2012.
- AGUS, N.; SARANGA, A. P.; ROSMANA, A.; SUGIARTI, A.. Viability And Conidial Production Of Entomopathogenic Fungi *Penicillium* SP. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 4, n. 1, p. 193-195, 2015.
- ALMEIDA, J. D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 231-240, 2006.
- ALMEIDA, L. C.; DIAS-FILHO, M. M.; ARRIGONI, E. B. Primeira ocorrência de *Telchin licus* (Drury, 1773), a broca gigante da cana-de-açúcar, no Estado de São Paulo. **Revista de Agricultura**, v.82, n.2, p.226-233, 2007.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Fealq, 1998.1163p.
- ALVES, R. T.; CARVALHO, G. S. First record of the sugarcane froghoppers *Mahanarva spectabilis* (Distant) and *Mahanarva liturata* (Le Peletier & Serville) infesting sugarcane plantations in the region of Goianésia (GO), Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 83-85, 2014.
- AUAD, A. M.; SIMÕES, A. D.; VANDER PEREIRA, A.; BRAGA, A. L. F.; SOBRINHO, F. S.; DA SILVA LÉDO, F. J.; PAULA-MORAES, S. V.; OLIVEIRA, A. A.; FERREIRA,

R. B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1077-1081, 2007.

AUAD, A. M.; CARVALHO, C. A. Desenvolvimento e viabilidade de ovos de *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) submetidos a diferentes regimes de hidratação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 711–714, 2009.

AUAD, A. M.; DOMINGUES, R.; MACHADO, M. A.; SOUZA, L. S.; CARVALHO, G. S.; PAULA-MORAES, S. V. Genetic variability of *Mahanarva* sp. (Hemiptera: Cercopidae) collected from different sites in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 1005-1010, 2010.

ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. D.; MOINO JR, A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. **Controle microbiano de insetos**, v. 2, p. 637-711, 1998. P.637-711.

BAPTISTUSSI, R. C.; MARGARIDO, L. A. C.; CASTILHO, H. J. Ação de efeitos ambientais na mortalidade natural da cigarrinha *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) comparada a inseticidas alternativos em cultivo orgânico de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 3, p. 151-158, 2011.

BECERRA VELÁSQUEZ, V.; PAREDES CÁRCAMO, M.; ROJO MERIÑO, C.; FRANCE IGLESIAS, A.; FRANCO DURÁN, J.. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 89-99, 2007.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A.. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycologia**, v. 98, n. 5, p. 737-745, 2006.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009.

CAMPAGNANI, M. O.; CAMPOS, W. G.; AMORIM, S. S.; ROSA, L. H.; AUAD, A. M.; CANGUSSÚ, M. A.; MAURÍCIO, R. M. Prospection and fungal virulence associated with *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) in an Amazon silvopastoral system. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 2, p. 426-432, 2017.

CANABRAVA, A.P. **História econômica**: Estudos e pesquisas. São Paulo: UNESP. 2005. 320p.

CASTRO, U.; MORALES, A.; PECK, D.C. Dinámica poblacional y fenología del salivazo de los pastos *Zulia carbonaria* (Lallemand) (Homptera: Cercopidae) em el valle geográfico del Río Cáuca, Colombia. **Neotropical Entomology** v. 34, n. 3, p. 459-470, 2005.

CHAVES, V. D. V.; PIMENTEL, G. V.; VALVERDE, A. H. P.; SILVA, L. A., BARBOSA, M. H. P.; PETERNELLI, L. A. Biology and preferred oviposition site of the *Mahanarva indentata* froghopper (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. **Florida Entomologist**, v. 97, n. 1, p. 73-79, 2014.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Cana-de-Açúcar: Quarto Levantamento Safra 2017/18**. CONAB, 2018. Disponível em: <[https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/17026\\_e0504d08aca77ee13e86c2e7e7f43424](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/17026_e0504d08aca77ee13e86c2e7e7f43424)>. Acesso em 23 dez. 2018.

CROUS, P. W.; GAMS, W., STALPERS, J. A.; ROBERT, V.; STEGEHUIS, G.. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 1, p. 19-22, 2004.

CURRAN, J.; DRIVER, F.; BALLARD, J. W. O.; MILNER, R. J Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. **Mycological Research**, v. 98, n. 5, p. 547-552, 1994.

DA COSTA, V. H. D.; SOARES, M. A.; RODRÍGUEZ, F. A. D.; ZANUNCIO, J. C., DA SILVA, I. M.; VALICENTE, F. H. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 796-798, 2015.

DA SILVA, D. C. V.; TIAGO, P. V.; DE SOUZA-MOTTA, C. M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas<sup>1</sup>. **Revista Brasil. Bot**, v. 34, n. 4, p. 607-610, 2011

DE FARIA, M. R.; 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.

DE MORAIS, L. K.; CURSI, D.; DOS SANTOS, J. M.; SAMPAIO, M.; CAMARA, T.; SILVA, P. D. A., ...; GAZAFFI, R. Melhoramento genético da cana-de-açúcar. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (INFOTECA-E)**. 2015.38P Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1042764/1/Doc200.pdf>>. Acesso em 01 out 2017.

DE OLIVEIRA, I. C. S.; MENDES, M. A. S. *Puccinia kuehnii*, um risco para a cultura de cana-de-açúcar no Brasil. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Comunicado Técnico**. 2008, 5p..Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/191184/3/cot1841008.pdf>> Acesso em 01 out 2017.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Informações agrônômicas**, v. 110, n. 1, p. 25-32, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. **Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônômico**, v. 1, p. 349-404, 2008.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V. Cana crua e *Sphenophorus levis*. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.27, n.5, p.23-24, 2009.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. C. A. 2.Ed. Cana-de-açúcar. Campinas: **Instituto Agrônômico**, 2010. p. 349-403.

DINARDO-MIRANDA, L. L. ; FRACASSO, J. V. Effect of insecticides applied at sugarcane planting on *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera; Curculionidae) control and on the yield of first two harvests. **Proceedings International Society of Sugar Cane Technology**, Boston, v. 27, 1-5p, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; DA COSTA, V. P.; FRACASSO, J. V.; PERECIN, D.; DE OLIVEIRA, M. C.; IZEPI, T. S.; LOPES, D. O. P. Resistance of sugarcane cultivars to *Mahanarva fimbriolata* (Stål)(Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical entomology**, v. 43, n. 1, p. 90-95, 2014.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. WH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, n. 2, p. 134-150, 2000.

EZEQUIEL; J. M. B.; GALATI, R. L.; MENDES, A. R.; FATURI, C.. Desempenho e características de carcaça de bovinos Nelore em confinamento alimentados com bagaço de cana-de-açúcar e diferentes fontes energéticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 2050-2057, 2006.

FORS, L. A. El salivazo aéreo *Mahanarva andigena*. **Sugar J., Oct**, p. 28-31, 2000.  
GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stål)(Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 4, p. 317-320, 2006.

FREITAS, A. F.; LOUREIRO, E. S.; DE ALMEIDA, M. E. B.; PESSOA, L. G. A. Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates for the control of *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854)(Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, p. 247-254, 2012.

GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, 2006.

GARCIA, J.F., GRISOTO, E.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; GLÓRIA, B.A. Feeding site of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. **Scientia Agrícola**, v. 64, n. 5, p. 555-557, 2007.

GONZÁLES, J. M. Castniinae (Lepidoptera: Castniidae) from Venezuela. V: *Castnia Fabricius* and *Telchin* (Hübner). **Boletín del Centro Investigaciones Biológicas**, Maracaibo, VEN, v. 37, p. 191- 201, 2003.

GUO HAI-LI; YE BAI-LIG; YUE YIG-YU; CHEN QING-TAO; FU CANG-SHENG. Three new species of *Metarhizium*. **Ada Mycologica Sinica** v.5, p.185-190, 1986.

GUAGLIUMI, P. Sugestões para o combate químico das cigarrinhas da cana no Nordeste do Brasil. I. **Brasil Açucareiro**, 1972. 55p.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, C.; GUZMÁN-FRANCO, A. W.; CARRILLO-BENÍTEZ, M. G.; ALATORRE-ROSAS, R.; RODRÍGUEZ-LEYVA, E.; VILLANUEVA-JIMÉNEZ, J. A. Specific diversity of *Metarhizium* isolates infecting *Aeneolamia* spp.(Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane plantations. **Neotropical entomology**, v. 45, n. 1, p. 80-87, 2016.

HOLMANN, F.; PECK, D. C. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: a first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 275-284, 2002

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**. IBGE, 2017.

Disponível em

<[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2015\\_v42\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2015_v42_br.pdf) > .

Acesso em 09 ago. 2017.

JOHNSTON, J. R. The Entomogenous Fungi of Porto Rico. Government of Porto Rico Board of Commissioners of Agriculture, Rio Pedras. **Bulletin**, v. 10, 1915.

LÓPEZ, F.; CARDONA, C.; MILES, J. W.; SOTELO, G.; MONTOYA, J. . Screening for resistance to adult spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) in *Brachiaria* spp.: methods and categories of resistance. **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 3, p. 1309-1316, 2009.

LOPES, D. O. P.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; BUSOLI, A. C. Atualidades em pragas da cultura da cana-de-açúcar: Sudeste e Nordeste do Brasil. In: BUSOLI, A. C.;

FRAGA, D. F.; SANTOS, L. C.; ALENCAR, J. R.C. C.; GRIGOLLI, J. F. J.; JANINI, J. C.; SOUZA, L. A.; VIANA, M. A.; FUNICHELLO, M. **Tópicos em Entomologia Agrícola** – IV. Jaboticabal: Maria de Lourdes Bandel (Gráfica e Editora Multipress), 2011, p.47-64.

LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; ROCHA, L. F.; MONTALVA, C.; LUZ, C.; HUMBER, R. A.; FARIA, M. *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal of invertebrate pathology**, v. 151, p. 165-168, 2018.

LOUREIRO, E. de S.; MONTEIRO, A. C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758)(Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 1, 2004.

LOUREIRO, E. D. S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E.; PESSOA, L. G. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål)(Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 791-798, 2005.

LOUREIRO, E. S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; MENDES, J. M.; PESSOA, L. G. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em condições de campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.1, p.47-53, 2012.

LUCCHESI, A. A. Sugarcane (In Brazilian). In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Ed.). **Ecophysiology of extractive crops: sugarcane, rubber, coconut, oil palm and olive**. Piracicaba: Cosmópolis Stoller do Brasil, v. 1. p. 13-45, 2001.

MACEDO, D.; ALVES, S.B.; VIEIRA, S. A. Screening of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains against *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854)(Hemiptera: Cercopidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 1, p. 47-52, 2006.

MACEDO, N.; MACEDO, D. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. **Visão agrícola**, v. 1, n. 1, 2004.

MADALENO, L.L.; RAVANELI, G.C.; PRESOTTI, L.E.; MUTTON, M.A.; FERNANDES, O.A.; MUTTON, M.J.R. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. **Neotropical entomology**, v. 37, n. 1, p. 68-73, 2008.

MARQUES, E. J.; LIMA, R. O. R.; OLIVEIRA, J. V. **Pragas da cana-de-açúcar: nordeste do Brasil**. Recife: EDUFRPE, 2009. 54 p.

MARTINELLI, D. P.; SPERS, E. E.; COSTA, A. F.. Ypióca–Introduzindo uma bebida genuinamente brasileira no mercado global. **O desafio das exportações”**. **PENSA/USP, São Paulo**, 2000. Disponível em: < [http://pensa.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Ypioca\\_introduzindo\\_uma\\_bebida\\_genuinamente\\_brasileira\\_no\\_mercado\\_global\\_2000.pdf](http://pensa.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Ypioca_introduzindo_uma_bebida_genuinamente_brasileira_no_mercado_global_2000.pdf) >. Acesso em 02 out 2017.

MEDO, J.; CAGÁN, L. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological control**, v. 59, n. 2, p. 200-208, 2011.

MENDONÇA, A.F. **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: INSETO & CIA. 1996. 239 p.

MENDONÇA, A. F.; FLORES, S.; SÁENZ, C. E. Cigarrinhas da cana-de-açúcar na América Latina e Caribe In: MENDONÇA, A. F. **Cigarrinhas da cana-de-açúcar: controle biológico**. Maceió: Insecta, 2005. p.51-94.

MENDONÇA, A. F.; MENDONÇA, I. C. B. R. Cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Cigarrinhas da cana-de-açúcar: controle biológico**. Maceió: Insecta, p. 95-200, 2005.

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.

MORAES, G. C.; AVILA, C. J. Insetos-praga associados ao solo na cultura da cana-de-açúcar, no estado de Mato Grosso do Sul. **Embrapa Agropecuária Oeste-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 37p, 2014.

MORALES, J. Egg diapause and pest management of *Aeneolamia varia* (Homoptera Cercopidae) in Venezuela. **Environmental Entomology**, v.22, n.5, p.1092-1095, 1993.

MOREIRA, S. G. **Artigos técnicos: manejo de pragas da cana-de-açúcar (Parte I)**. 2004.

NUNES-JÚNIOR, D. O estado da arte sobre *Migdolus* spp. (Coleoptera: Cerambycidae). In: CHIARINELLI, M. D. O estado do conhecimento sobre o *Migdolus*. Tarumã: **CIA Agrícola Nova América**, 1996. p.5-15.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

PAULA-MORAES, S.V.; CARVALHO, G.S.; RAMOS, A.K.B.; AUD, A.M.; TAKADA, S.; BARCELLOS, A.O. Ocorrência da cigarrinha-das-pastagens *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) em gramíneas forrageiras e sua distribuição em áreas de Cerrado e na Amazônia Legal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessoa. **Anais**. Sociedade Brasileira de Zootecnia. CD-ROM. 2006. 5p.

PIRES, C. S. S.; PRICE, P. W.; OLIVEIRA, R. C. de. Distribution of the spittlebug *Deois flavopicta* Stal (Homoptera: Cercopidae) on wild and cultivated host species. **Anais da Sociedade Entomologica Brasileira**, Londrina , v. 29, n. 3, p. 401-412, Sept. 2000.

PECK, D. C.; RODRÍGUEZ C.H, J.; GÓMEZ, L. A. Identity and first record of the spittlebug *Mahanarva bipars* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopidae) on sugarcane in Colombia. **Florida entomologist**, v. 87, n. 1, p. 82-84, 2004.

QUESADA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; MARANHÃO, E. A.; ORTIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological research**, v. 111, n. 8, p. 947-966, 2007.

RAKOTONIRAINY, M. S.; CARIOU, M. L.; BRYGOO, Y.; RIBA, G. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. **Mycological Research**, v. 98, n. 2, p. 225-230, 1994.

RAMOS, I. M. **Biologia da cigarrinha-da-pastagem *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae)**. 1976. 72f. Dissertação – Piracicaba; Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1976.

RESENDE, T. T.; AUAD, A. M.; FONSECA, M. D. G.; DOS SANTOS, T. H.; VIEIRA, T. M. Impact of the spittlebug *Mahanarva spectabilis* on signal grass. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

RESENDE, T. T.; AUAD, A. M.; FONSECA, M. G. How many adults of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) should be used for screening *Brachiaria ruziziensis* (Poales: Poaceae) resistance?. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 1, p. 396-402, 2014.

REZENDE, J. M.; ZANARDO, A. B. R.; DA SILVA LOPES, M.; DELALIBERA JR, I.; REHNER, S. A. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. **BioControl**, v. 60, n. 4, p. 495-505, 2015.

ROCHA, L. F.; INGLIS, P. W.; HUMBER, R. A.; KIPNIS, A.; E LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 3, p. 251-259, 2013.

RODHE, C.; ALVES, L. F.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B.; SILVA, E. D.; ALMEIDA, J. D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 231-240, 2006.

SANGUINO, A. As principais doenças da cana-de-açúcar. In: **Curso à Distância Tópicos Da Cultura de Cana-De-Açúcar**. Instituto Agrônômico, 2012.

SILVA, S. E. B.; AUAD, A. M.; MORAES, J. C.; ALVARENGA, R.; CLAUDINO, S. S.; RESENDE, T. T. Biological Performance and Preference of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) for Feeding on Different Forage Plants. **Journal of economic entomology**, v. 110, n.4, p. 1877-1885, 2017.

SMALL, C. N.; BIDOCHKA, M. J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycological research**, v. 109, n. 3, p. 307-313, 2005.

SOBRINHO, F. S.; AUAD, A. M.; DA SILVA-LÉDO, F.J.. Genetic variability in *Brachiaria ruziziensis* for resistance to spittlebugs. **Crop Breeding & Applied Biotechnology**, v. 10, n. 1, pg. 83–88, 2010.

SOULIER-PERKINS, A. (2018) COOL - Cercopoidea Organised On Line. Disponível em < <https://www.hemiptera-databases.org/cool/>>. Acesso 27 mar 2018.

STEINWENDER, B. M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; THORUP-KRISTENSEN, K.; MEYLING, N. V. (2014). Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. **Journal of invertebrate pathology**, v. 123, p. 6-12, 2014.

ST LEGER, R. J. S.; WANG, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 901-907, 2010.

SUN, B.D.; LIU, X. Z.. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. **Applied soil ecology**, v. 39, n. 1, p. 100-108, 2008.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 66, n. 3, p. 407-411, 1976.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA. Açúcar e Álcool do Brasil – Commodities da Energia e do Meio Ambiente. União da Indústria de cana-de-açúcar de São Paulo. 2004.

VALERIO, J. R.. Cigarrinhas-das-pastagens. **Embrapa Gado de Corte-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

VALERIO, J.; TORRES, F.; MORAES, L. D. O.; KALACHE, S.; STEFANELLO, A.; OLIVEIRA, M. Avaliação de híbridos do gênero *Brachiaria* quanto ao nível de antibiose à cigarrinha-das-pastagens *Notozulia entreriana* (Hemiptera: Cercopidae). **O Biológico**, São Paulo, SP, v. 75, n. 2, p 97, jul./dez. 2013.

WAKIL, W.; GHAZANFAR, M. U.; RIASAT, T.; QAYYUM, M. A.; AHMED, S.; YASIN, M. Effects of interactions among *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis* and chlorantraniliprole on the mortality and pupation of six geographically distinct *Helicoverpa armigera* field populations. **Phytoparasitica**, v. 41, n. 2, p. 221-234, 2013.

WRAIGHT, S. P.; CARRUTHERS, R. I.; JARONSKI, S. T.; BRADLEY, C. A.; GARZA, C. J.; GALAINI-WRAIGHT, S. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Biological Control**, v. 17, n. 3, p. 203-217, 2000.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as biocontrol agent. **Pesticide Science**, v. 37, p.375-379, 1993.

ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. Piracicaba, Brasil: Fealq, 1993.

### **3 CAPITULO I**

**Cigarrinhas da cana-de-açúcar no Nordeste brasileiro.**

## RESUMO

As cigarrinhas (*Mahanarva* spp.) são pragas de grande importância econômica em várias regiões do país. Muitas espécies têm variação no padrão de coloração alar e tamanho corporal, parâmetros que leva muitas vezes à identificação de forma incorreta. Realizou-se este trabalho com o objetivo de identificar as espécies de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* que ocorrem em canaviais do Nordeste. Adultos de cigarrinhas foram coletados em canaviais nos municípios de Murici e Maceió em Alagoas, Lagoa de Itaenga e Camutanga em Pernambuco, São Raimundo das Mangabeiras no Maranhão e União e Boa Hora, microrregião de Teresina no Piauí e identificados através da análise da genitália do macho. As cigarrinhas coletadas são representantes de três espécies: *M. spectabilis*, *M. fimbriolata* e *M. posticata*, sendo este o primeiro registro da espécie *M. spectabilis* atacando canaviais no estado do Piauí e Maranhão. Em canaviais de Alagoas foram encontradas as espécies *M. posticata* e *M. fimbriolata* e em Pernambuco, apenas *M. posticata*.

Palavras-chave: Cigarrinha das pastagens, Ocorrência, Registro.

## Spittlebugs from sugarcane in northeastern Brazil

### ABSTRACT

The spittlebugs (*Mahanarva* spp.) are pests of great economic importance in various regions of the country; many species have variation in the alar coloration pattern and body size, parameters that often leads to incorrect identification. This work was carried out with the objective of identifying the spittlebugs of the genus *Mahanarva* that occur in sugarcane plantations in the Northeast. Adult spittlebugs were collected in plantations in the municipalities of Murici and Maceió in Alagoas, Lagoa de Itaenga and Camutanga in Pernambuco, São Raimundo das Mangabeiras in Maranhão and União and Boa Hora, microregion of Teresina in Piauí, and were mounted and identified through the analysis of the male genitalia. The spittlebugs collected are representatives from three species *M. spectabilis*, *M. fimbriolata* and *M. posticata*, this being the first record of the species *M. spectabilis* attacking sugarcane plantations in the State of Piauí and Maranhão. In sugarcane plantations of Alagoas have been found the species *M. posticata* and *M. fimbriolata* and Pernambuco, only *M. posticata*.

Keywords: Spittlebug, Occurrence, Record.

As cigarrinhas do gênero *Mahanarva* (Hemiptera: Cercopidae) são consideradas pragas que causam severos danos a várias espécies de gramíneas de importância econômica para o Brasil e o mundo, tais como *Saccharum* spp. (cana-de-açúcar), *Pennisetum purpureum* Schumacher, 1827 (Capim elefante) e *Brachiaria ruziziensis* Germain and Evrard, 1953 (Capim braquiária). Estimativas apontam perdas causadas por estes insetos ao redor de 2 bilhões de dólares por ano no mundo (AUAD et al, 2007; DINARDO-MIRANDA, 2014; SOBRINHO et al., 2010).

Popularmente esses insetos são conhecidos como cigarrinhas das pastagens ou cigarrinhas da cana-de-açúcar, e, em comum, as espécies desse gênero causam danos ao se alimentarem da seiva das plantas; tanto as formas jovens quanto os adultos injetam substâncias tóxicas às plantas, que causam necrose foliar, perda do conteúdo de clorofila comprometendo o processo fotossintético, reduzindo o crescimento e produção das plantas; além disso, as formas jovens extraem grandes quantidades de água e nutrientes diretamente de raízes, enquanto que os adultos succionam seiva das folhas onde injetam toxinas (DINARDO-MIRANDA, 2014; GARCIA et al., 2007; RESENDE et al., 2012; RESENDE; AUAD; FONSECA, 2014).

O gênero *Mahanarva* foi descrito inicialmente por Distant em 1909, tendo *Mahanarva indicata*, como espécie-tipo, cuja origem é atribuída ao Brasil. Atualmente o gênero possui 46 espécies descritas (ALVES; CARVALHO, 2014; PALADINI; CAVICHIOLI, 2014). No Brasil as espécies *Mahanarva fimbriolata* (Stål 1854) e *Mahanarva posticata* (Stål, 1855) são comumente encontradas em cana-de-açúcar, onde provocam significativas perdas; Dinardo-Miranda (2014), entretanto, cita que *M. fimbriolata* é pouco comum em canaviais da região Sudeste do Brasil, onde predomina outra espécie de *Mahanarva*, cuja identificação ainda não está clara. *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) está constantemente associada a pastagens, onde é considerada fator limitante ao desenvolvimento destas, no entanto, foi registrada uma única vez atacando canaviais em Goiás, em conjunto com *Mahanarva liturata* (Le Peletier and Serville, 1825), constituindo o primeiro registro destas espécies em cana-de-açúcar no Brasil (ALVES; CARVALHO, 2014; AUAD et al., 2011; PEIXOTO et al., 2009).

Espécies de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* apresentam uma ampla diversidade no padrão de coloração de asas, além de semelhanças no tamanho corporal, características sujeitas a plasticidade fenotípica, o que muitas vezes torna difícil a identificação correta de espécies visto que estas características, em conjunto

com a morfologia da genitália do macho são as principais características distintivas entre as espécies (CASTRO et al., 2007; PALADINI et al., 2018A; PALADINI et al., 2018B). Marcadores moleculares também são utilizados como ferramentas que auxiliam a correta identificação de espécies de *Mahanarva*, no entanto são utilizados com menos frequência que os caracteres morfológicos (AUAD et al., 2010A; PALADINI et al., 2018B)

Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar as espécies de cigarrinhas que ocorrem em canaviais de estados do nordeste do Brasil.

Foram realizadas coletas manuais de adultos de cigarrinhas em cana-de-açúcar nos municípios de Rio Largo e Murici em Alagoas, Lagoa de Itaenga e Camutanga na Zona da mata Norte de Pernambuco, São Raimundo das Mangabeiras no Maranhão e União e Boa Hora, microrregião de Teresina em Piauí. As cigarrinhas foram mantidas em recipientes plásticos contendo etanol 70% e transportadas ao laboratório, onde foram quantificadas, armazenadas em tubos *falcon* e encaminhadas para especialista do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas para identificação das espécies. A identificação das espécies foi realizada através das peças da genitália dos machos.

Um total de 523 cigarrinhas foram coletadas, estas, são representantes de três espécies: *M. spectabilis*, *M. fimbriolata* e *M. posticata* (Tabela 1). Nos canaviais do Piauí constatou-se que as cigarrinhas coletadas são *M. spectabilis*, no Maranhão encontrou-se *M. spectabilis* e *M. fimbriolata*, em Pernambuco apenas cigarrinha das folhas *M. posticata* e em Alagoas foram constadas *M. fimbriolata* e *M. posticata*, sendo este o primeiro registro da espécie *M. spectabilis* atacando canaviais no estado do Piauí e Maranhão.

**Tabela 1** Espécies de cigarrinhas coletadas em canaviais do Nordeste, Brasil

| Local                 | Coordenadas geográficas     | Espécie                    | Nº de Indivíduos |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------|
| Murici AL             | 09°13'S<br>35°50'W          | <i>Mahanarva posticata</i> | 35               |
| Rio Largo – AL        | 9°27'56,8"S<br>35°49'49.1"W | <i>M. fimbriolata</i>      | 47               |
| Lagoa de Itaenga – PE | 7°53'13.6"S<br>35°14'24.8"W | <i>M. posticata</i>        | 41               |
| Camutanga-PE          | 7°25'09.9"S<br>35°15'30.0"W | <i>M. posticata</i>        | 59               |

Tabela 01 Continua.

|  |  |  |                   |
|--|--|--|-------------------|
| <b>São Raimundo das mangabeiras – MA</b> | <b>6°46'53,4'' S<br/>45°52'41,7''W</b> | <b><i>M. spectabilis</i> e <i>M. fimbriolata</i></b> | <b>45 (33/12)</b> |
| <b>Boa Hora – PI</b>                     | 4°53'18.9''S<br>42°52'40.6''W          | <i>M. spectabilis</i>                                | 145               |
| <b>União – PI</b>                        | 04°51'4,68'' S<br>42°53'24,66''W       | <i>M. spectabilis</i>                                | 151               |

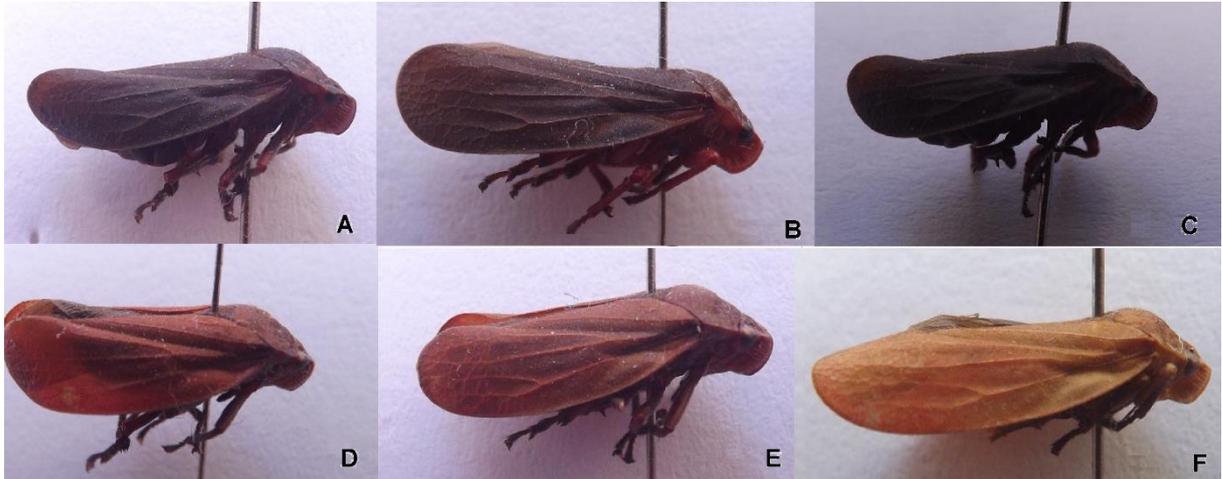
*Mahanarva spectabilis* é uma praga associada com frequência a pastagens, cultivadas como *P. purpureum*, *B. brizantha*, considerada um dos principais problemas que limitam o desenvolvimento de gramíneas forrageiras, no entanto, são raros o registro dessa espécie causando danos em cana-de-açúcar, com apenas um registro no Brasil (AUAD et al., 2007; AUAD et al., 2010B; ALVES; CARVALHO, 2014).

Muitas espécies de cercopídeos têm variação no padrão de coloração de asas. Esta variação possibilitou que espécimes de *Mahanarva* spp. tivessem semelhanças no padrão das tégminas, podendo somente ser diferenciadas pelas peças da genitália do macho (ALVES; CARVALHO, 2014). *Mahanarva spectabilis* apresenta uma grande variação no padrão de coloração das asas (Figura 1), padrão este bastante semelhante ao de *M. fimbriolata*, o que pode acarretar confusões na correta identificação da espécie presente na área. Assim, ressalta-se a necessidade da identificação através da análise genitália dos machos e não apenas baseados na visualização do padrão de coloração de asas. As peças da genitália do macho de *M. spectabilis* (Figura 2B) apresentam edeago com processo dorsal curvo na extremidade e em forma de foice (Figura 2) (ALVES; CARVALHO, 2014).

Quatro padrões de coloração de asas foram descritos em *M. spectabilis* coletadas em pastagens em Brasília (DF) e Presidente Prudente (SP), amarelo-palha com manchas negras longitudinais, avermelhado com manchas negras longitudinais, totalmente avermelhadas e totalmente negras. No Pará, para essa mesma espécie, dois padrões foram encontrados em *M. spectabilis* (AUAD et al., 2010B; PALADINI et al., 2018A). Os indivíduos desta espécie coletados no Maranhão e Piauí apresentaram cinco padrões de coloração de asa: marrons (Figura 1A e B), negras (Figura 1C), avermelhadas (Figura 1D), avermelhadas com manchas escuras na região posterior da asa (figura 1E) e amarelo-palha (Figura 1F), mudanças rápidas durante sua evolução, associadas à manifestação fenotípica de uma defesa química são fatores

que contribuem para essa ampla diversidade de padrões de coloração de asas apresentada por cercopódeos (PALADINI et al., 2018B).

As espécies *M. fimbriolata*, *M. posticata* e *M. spectabilis* estão presentes em canaviais do Nordeste do Brasil. Este trabalho relata a primeira ocorrência de *M. spectabilis* em cana-de-açúcar nos estados Piauí e Maranhão, Brasil.



**Figura 1** Padrão de coloração de asas exibido por *M. spectabilis* coletada em cana-de-açúcar no Piauí e Maranhão.



**Figura 2** A: Genitália de macho de *M. fimbriolata*; B: Genitália de macho de *M. spectabilis*

Fonte: DINARDO-MIRANDA (2018)

## REFERÊNCIAS

AUAD, A. M.; SIMÕES, A. D.; VANDER PEREIRA, A.; BRAGA, A. L. F.; SOBRINHO, F. S.; DA SILVA LÉDO, F. J.; PAULA-MORAES, S.V.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, R. B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1077-1081, 2007.

AUAD, A. M.; DE CARVALHO, C. A.; DA SILVA, D. M.; DERESZ, F. Flutuação populacional de cigarrinhas-das-pastagens em braquiária e capim-elefante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1205-1208, 2010B.

AUAD, A. M.; DOMINGUES, R.; MACHADO, M. A.; SOUZA, L. S.; CARVALHO, G. S.; PAULA-MORAES, S. V. Genetic variability of *Mahanarva* sp. (Hemiptera: Cercopidae) collected from different sites in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 1005-1010, 2010A.

AUAD, A. M.; SIMOES, A. D.; LEITE, M. V.; DA SILVA, S. E. B.; DOS SANTOS, D. R.; MONTEIRO, P. H. Seasonal dynamics of egg diapause in *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) on elephant grass. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 325-330, 2011.

ALVES, R. T.; CARVALHO, G. S.. First record of the sugarcane froghoppers *Mahanarva spectabilis* (Distant) and *Mahanarva liturata* (Le Peletier & Serville) infesting sugarcane plantations in the region of Goianésia (GO), Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 83-85, 2014.

CASTRO, U.; CARDONA, C.; VERA-GRAZIANO, J.; MILES, J.; GARZA-GARCIA, R.. Identificación morfológica y molecular de *Prosapia simulans* (Walker) (Hemiptera: Cercopidae), y selección y mecanismos de resistencia a este salivazo en híbridos de Brachiaria. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 5, p. 815-815, 2007.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Nematoides e pragas da cana-de-açúcar. 1ª. Ed.** Instituto Agronômico: Campinas, 2014. 400p.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Nematoides e pragas da cana-de-açúcar. 2ª. Ed.** Instituto Agronômico: Campinas, 2018. 444p.

GARCIA, J.F.; GRISOTO, E.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; GLÓRIA, B.A. Feeding site of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 5, p. 555-557, 2007.

PALADINI, A.; CAVICHIOLI, R. R. Taxonomic notes on *Mahanarva* (Ipiranga) (Hemiptera, Cercopidae) with description of a new species. **Zootaxa**, v. 3861, n. 5, p. 479-486, 2014.

PALADINI, A.; DOMAHOVSKI, A. C.; KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A. Reports of new wing color polymorphism and taxonomic information to cercopids (Auchenorrhyncha: Cercopidae) from upland rice crop, Pará State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 728-735, 2018A.

PALADINI, A.; TAKIYA, D. M.; URBAN, J. M.; CRYAN, J. R. New World spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae: Ischnorhininae): Dated molecular phylogeny, classification, and evolution of aposematic coloration. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 120, p. 321-334, 2018B.

PEIXOTO, M. F.; BARBOSA, R. V.; FERNANDES, P. M.; AUGUSTO, R. B. S.; OLIVEIRA, R. R. C. Controle e perdas provocadas por *Mahanarva fimbriolata* (Stål)(Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Global Science and Technology**, v. 2, n. 1, 2009.

RESENDE, T. T.; AUAD, A. M.; FONSECA, M. D. G.; DOS SANTOS, T. H.; VIEIRA, T. M. Impact of the spittlebug *Mahanarva spectabilis* on signal grass. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

RESENDE, T. T.; AUAD, A. M.; FONSECA, M. G. How many adults of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) should be used for screening *Brachiaria ruziziensis* (Poales: Poaceae) resistance? **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 1, p. 396-402, 2014.

SOBRINHO, F. S.; AUAD, A. M.; DA SILVA-LÉDO, F.J. Genetic variability in *Brachiaria ruziziensis* for resistance to spittlebugs. **Crop Breeding & Applied Biotechnology**, v. 10, n. 1, pg. 83–88, 2010.

## 4 CAPITULO II

**Aspectos bioecológicos de *Mahanarva spectabilis* (Stål, 1854) (Hemiptera:  
Cercopidae)**

## RESUMO

*Mahanarva spectabilis* é uma das principais pragas de pastagens no Brasil e apresenta grande potencial para causar danos em cana-de-açúcar. Objetivou-se investigar aspectos bioecológicos de *M. spectabilis* em cana-de-açúcar, foram realizadas amostragens de ninfas e adultos em plantio comercial de cana-de-açúcar por um período de 12 meses, além de avaliar a duração da diapausa e o desenvolvimento de ovos mantidos em câmara incubadora B.O.D.. O pico populacional de ninfas ocorreu no mês de junho de 2016 e nos meses de fevereiro a abril de 2017. Não houve correlação significativa entre o número de adultos coletados e os elementos climáticos estudados. *Mahanarva spectabilis* apresenta picos populacionais logo após a incidência das chuvas. A diapausa em ovos de *M. spectabilis* tem duração de 240 dias. O desenvolvimento embrionário apresenta quatro fases distintas, onde os ovos entram em diapausa na segunda fase de desenvolvimento.

Palavras-chave: diapausa, período embrionário, flutuação populacional, temperatura, umidade.

**Bioecological aspects of *Mahanarva spectabilis* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae)**

**ABSTRACT**

*Mahanarva spectabilis* is one of the main pasture pests in Brazil and has great potential to cause damage in sugarcane. The objective of this study was to investigate the bioecological aspects of *M. spectabilis* in sugarcane. Sampling of nymphs and adults during commercial planting of sugarcane was carried out for a period of 12 months, as well to evaluate the duration of diapause and the development of eggs kept in the incubator chamber B.O.D.. The population peak of nymphs occurred in June 2016 and in the months of February to April 2017. There was no significant correlation between the number of adults collected and the climatic elements studied. *Mahanarva spectabilis* presents population peaks soon after the rainfall incidence. The diapause in eggs of *M. spectabilis* lasts 240 days. Embryonic development presents four distinct phases, where eggs enter diapause in the second stage of development.

Keywords: diapause, embryonic period, population fluctuation, temperature, moisture.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Diversas espécies de cigarrinhas da família Cercopidae (Hemiptera) são pragas de gramíneas forrageiras e cana-de-açúcar na América do Sul (CARVALHO; WEBB, 2005). No Brasil as espécies *Deois flavopicta* (Stal, 1854), *Zulia entreriana* (Berg, 1879), *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) e *M. spectabilis* (Distant, 1909) ocorrem com frequência em pastagens cultivadas com capim braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf e *B. ruzizensis* Germain & Everard) e capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), já as espécies *M. posticata* (Stal, 1854), *M. fimbriolata* e *M. indentata* (Walker, 1858) ocorrem em cana-de-açúcar (AUAD et al., 2007; BERNARDO et al., 2003; DINARDO-MIRANDA, 2008; MADALENO et al., 2008; MARQUES et al., 2009).

O incremento de áreas de pastagens, principal substrato alimentar das cigarrinhas, tem provocado o aumento populacional destes indivíduos, que passam a atacar outras culturas como arroz, milho e cana-de-açúcar (CRUZ et al., 2010; FERREIRA et al., 2003; PALADINI et al., 2018; SANTOS et al., 1982). *Mahanarva spectabilis*, embora considerada uma das principais pragas em capim elefante e braquiária, tem sido relatada em cultivos de cana-de-açúcar no Brasil em áreas cujos ataques eram atribuídos a cigarrinha das raízes da cana-de-açúcar (*M. fimbriolata*), tornando-se uma ameaça para esta cultura (ALVES; CARVALHO, 2014; AUAD et al., 2007).

Altas infestações de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* são observadas durante a estação chuvosa do ano, e, durante o período seco, os ovos depositados no solo tendem a entrar em diapausa, assim como verificado em várias outras espécies de cercopídeos (CASTRO et al., 2005; GARCIA et al., 2006; MORALES, 1993). A diapausa é um mecanismo que confere aos organismos a capacidade de transpor períodos de adversidade que serão limitantes ao seu desenvolvimento (MARTINS; BARBEITOS, 2000). Esse mecanismo de resistência é relatado com frequência em ovos de cercopídeos, principalmente nos gêneros *Deois* e *Mahanarva*, e possibilita o surgimento de picos populacionais desses insetos logo após a ocorrência das primeiras chuvas (AUAD et al., 2011; DINARDO-MIRANDA et al., 2004; LOHMANN et al., 2010; SIMÕES et al., 2013).

O conhecimento sobre o desenvolvimento do estágio de ovos, principalmente relacionados a diapausa, se torna uma importante informação para subsidiar

estratégias no manejo dos cercopídeos, pois a partir destes, pode-se entender suas flutuações sazonais, bem como prever a ocorrência de picos populacionais e assim tomar decisões a respeito de métodos de controle (AUAD et al., 2011; SUJII et al., 2002).

Estudos sistemáticos sobre a diapausa e estádios de desenvolvimento de ovos de *M. spectabilis* são incipientes, embora já tenham sido iniciados (AUAD et al., 2011). Deste modo, estudou-se o comportamento populacional em campo e diapausa em ovo de *M. spectabilis*, objetivando identificar o estágio de desenvolvimento do início da diapausa, bem como diferenciar e descrever os estádios de desenvolvimento em ovos de *M. spectabilis* em cana-de-açúcar.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia do Setor de Fitossanidade do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e na Usina COMVAP situada na microrregião de Teresina, no município de União, na região Norte do estado do Piauí.

Amostragens de *M. spectabilis* foram realizadas em plantio comercial de cana-de-açúcar pertencente a Usina COMVAP, a fim de verificar a ocorrência do início da infestação em campo. As coletas de ninfas e adultos foram realizadas quinzenalmente, durante 13 meses (junho de 2016 a junho de 2017), entretanto houve, uma janela nas amostragens, entre agosto de 2016 a janeiro de 2017, correspondente ao período de colheita da cana-de-açúcar e, portanto, não sendo possível realizar coleta devido à ausência de plantas na área de estudo.

As ninfas foram amostradas em 2 m linear de sulco e 20 repetições dentro da área de estudo (700 m<sup>2</sup>), sendo contabilizadas ninfas próximas as raízes (Adaptado de KASSAB et al., 2012). Para visualização dos insetos nas raízes, a palha foi cuidadosamente afastada (manualmente) do sulco de plantio da cana e retirados os insetos da região radicular, na superfície do solo, com auxílio de um palito de madeira, com cerca de 20 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro.

Para as amostragens dos adultos foram instaladas armadilhas constituídas por cartões adesivos amarelos “Biotrap<sup>®</sup>” (10 x 24,5 cm). Dentro da área de estudo foram colocadas 25 armadilhas, dispostas em linhas e equidistantes 10 m entre si e com altura de 25 cm do solo; substituídas por ocasião da coleta. As armadilhas coletadas

foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia do Departamento de Fitotecnia/CCA-UFPI, onde passaram por triagem para identificação e quantificação dos espécimes aderidos nestas. Os espécimes foram depositados na coleção entomológica do laboratório para consultas posteriores.

A flutuação populacional das cigarrinhas foi correlacionada com dados de precipitação pluviométrica (mm), umidade relativa do ar (%) e temperatura (°C), referentes aos meses de pesquisa, que foram obtidos através da estação agrometeorológica automatizada, localizada na usina COMVAP (Latitude 04°51'4,68" S, Longitude 42°53'24,66"), próximo à área experimental, contendo termohigrômetro e pluviômetro.

Através do programa SAS Institute (SAS Institute 2001) foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre o número de adultos coletados em armadilhas amarela, bem como o número de ninfas por metro linear com a precipitação, temperatura e umidade relativa do período.

Adultos de *M. spectabilis* foram coletados no mês de agosto de 2016 (última geração anual) e levados ao Laboratório de Entomologia, objetivando estudar a diapausa. Confinaram-se três casais em gaiolas retangulares de madeira revestidas com tela de nylon contendo duas mudas de cana-de-açúcar como substrato de alimentação e oviposição. A muda recebeu ao redor do colmo, na altura do solo, discos de algodão umedecido com água destilada, para oviposição (metodologia adaptada de GARCIA et al., 2006). Após 24 horas de confinamento, os algodões foram retirados das gaiolas e procedeu-se, com auxílio de estiletes, alfinetes e pinceis, a separação manual dos ovos. Estes ovos foram isolados em placas de Petri forradas com papel filtro umedecido com água destilada, repostas diariamente e mantidas em incubadora B.O.D. a 25 °C, fotofase de 12 horas. Avaliou-se diariamente a eclosão dos ovos, até que restassem somente os ovos considerados como diapaúsicos, sem eclosão 30 dias após postura (CASTRO et al., 2005).

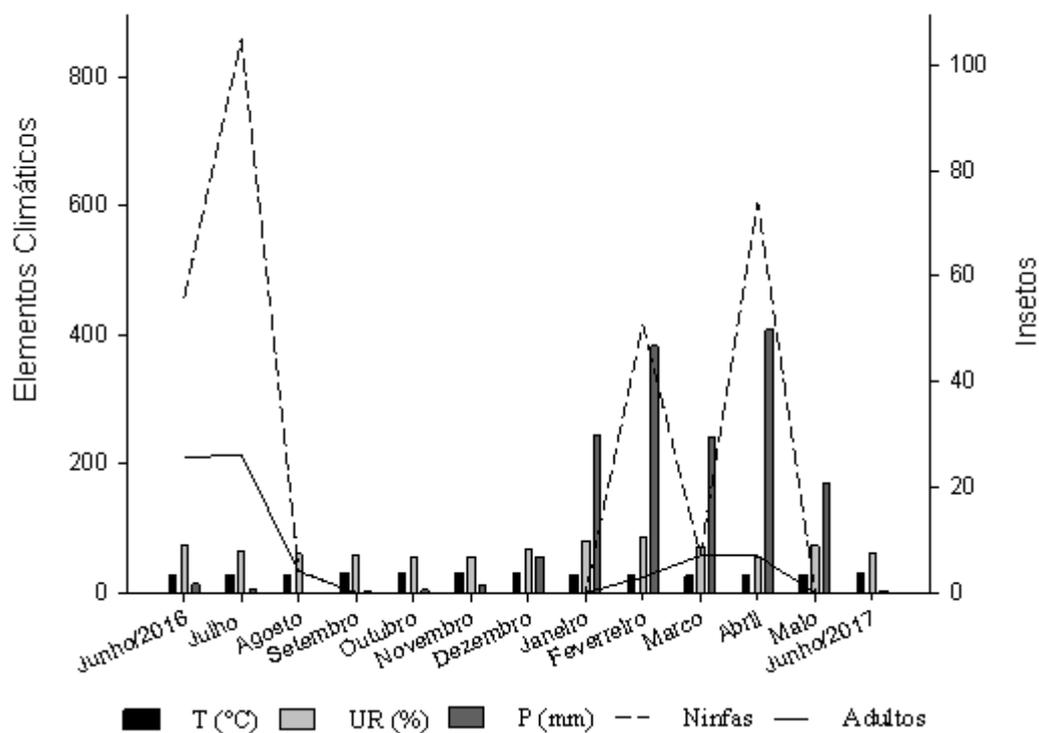
Dos ovos restante, 200 ovos foram selecionados ao acaso e avaliados por um período de 60 dias após postura, visando a identificação de ovos que entram em diapausa. Simulando as condições de campo durante o período (sem chuvas) foi cessada a umidificação diária das placas, e, 200 dias após postura, quando o período chuvoso foi reiniciado e verificou-se nova geração de cigarrinhas em campo, a umidificação diária das placas foi retomada.

Estádios de desenvolvimento de ovos de *M. spectabilis* - Adultos de *M. spectabilis* foram coletados no mês de abril de 2017. Dois casais foram isolados para obtenção dos ovos e, 24 horas após confinamento, selecionou-se 100 ovos de boa aparência, coloração translúcida (aparentemente viáveis) para que fossem acompanhados diariamente até a eclosão ou constatação de diapausa. Os ovos foram isolados em placas de Petri forradas com papel filtro umedecido com água destilada, os quais receberam numeração (1 a 100), onde os ovos foram posicionados (acima da numeração) e mantidos em incubadora B.O.D. a 25 °C, fotoperíodo de 12 horas. Diariamente, por 30 dias, com auxílio de estereoscópio (aumento padronizado de 20x) com câmera Motic acoplada e software Motic Images plus 2.0, foram avaliadas e registradas as alterações morfológicas nos ovos para definição e descrição das fases de desenvolvimento do período embrionário. Após esse período, para os ovos considerados em diapausa, foram realizadas observações diárias por 60 dias após postura, para verificação de eclosões e confirmação da pausa.

Foram selecionados 20 ovos ao acaso e, nestes, com auxílio do software Motic Images plus 2.0, foram obtidas as medidas de largura e comprimento por um período de 12 dias, quando as eclosões tiveram início. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, as médias de comprimento, foram submetidas a análise de variância e comparados pelo teste de Tukey a 1% de significância, para os dados que não apresentaram normalidade, (médias de largura) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, através do software Assistat 7.7 Beta.

#### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Houve ocorrência de ninfas e adultos de *M. spectabilis* em cana-de-açúcar nos meses de junho a agosto de 2016, com pico populacional de ninfas no mês de julho de 2016 e nos meses de fevereiro e abril de 2017 (Figura 1). O número de ninfas coletadas apresentou correlação positiva e significativa para precipitação ( $r = 0,60$ ;  $P=0,02$ ) e correlação negativa significativa com temperatura ( $r = -0,57$ ;  $P=0,04$ ), mostrando a influência direta que estes fatores apresentam sobre *M. spectabilis*. Não houve correlação significativa entre o número de adultos coletados e os elementos climáticos avaliados (Tabela 1).



**Figura 1** Relação entre ninfas e adultos de *M. spectabilis* e elementos climáticos em cana-de-açúcar em União, Piauí, nos meses de junho de 2016 a junho de 2017.

**Tabela 1** Correlação linear simples entre os elementos climáticos e a infestação de *Mahanarva spectabilis* em cana-de-açúcar. União, Piauí (2017)

| Elementos Climáticos | Coeficiente de Pearson (r) e probabilidade (P) |       |             |      |
|----------------------|--|-------|-------------|------|
|                      | Ninfas (r)                                     | P     | Adultos (r) | P    |
| Temperatura (°C)     | -0,57  | 0,04* | -0,51       | 0,07 |
| Umidade Relativa (%) | 0,19   | 0,52  | 0,14        | 0,62 |
| Precipitação (mm)    | 0,60   | 0,02* | -0,14       | 0,64 |

\*significativa a 5% de probabilidade.

Vários fatores podem interferir na ocorrência e no crescimento populacional de insetos nos agroecossistemas. Entretanto, a incidência de ninfas do gênero *Mahanarva* é mais dependente da variação de temperatura (°C), enquanto a incidência de adultos depende da umidade relativa (%) (BARBOSA et al. 2014). Entretanto, percebe-se que fatores físicos como a queima da palhada do canavial realizada no mês de setembro, em virtude da colheita, pode ter influenciado na

redução da incidência de cigarrinhas-das-raízes na cana-de-açúcar. Apesar da inexistência de insetos na área neste período, pôde-se constatar, novamente o início da infestação de cigarrinhas, no mês de fevereiro, aproximadamente 150 dias após a última coleta de cigarrinhas; logo, pode-se inferir que essa nova população é oriunda dos ovos diapaúsicos depositados no campo antes da queima da palhada do canavial.

Picos populacionais podem ser observados logo após a incidência da chuva nos meses de fevereiro, março e abril. A chuva é um dos fatores que pode desencadear o fim do período diapaúsico em ovos de cercopídeos, pois disponibilizará a água necessária para o desenvolvimento embrionário e incubação dos ovos (LOHMANN et al., 2010; SUJII et al., 2001). Fotoperíodo e temperatura também exibem grande influência sobre o término do período, este, também pode ser cessado espontaneamente independentemente de qualquer fator externo (MARTINS; BARBEITOS, 2000).

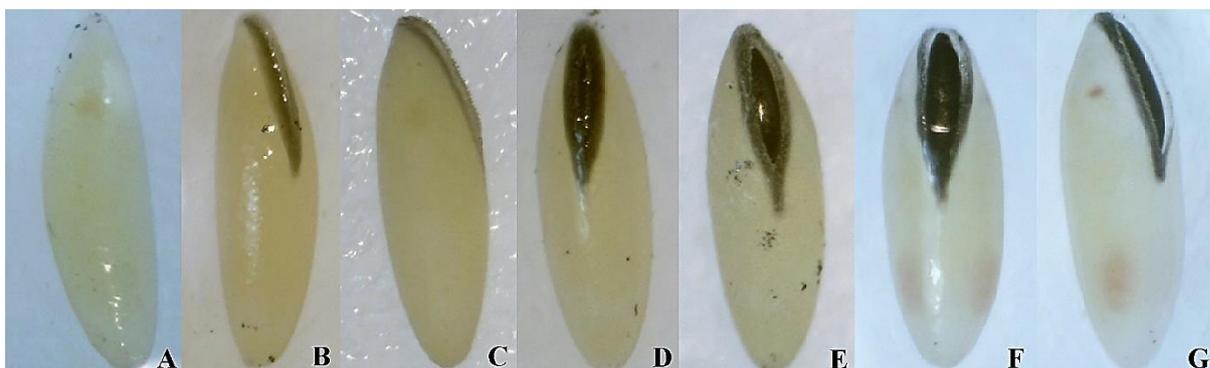
O início das eclosões dos ovos ocorreu a partir de abril de 2017, totalizando um período incubação de 240 dias (8 meses) para ovos de *M. spectabilis*, caracterizando estes ovos, como diapaúsicos. Esses dados, estão muito próximos a aqueles obtidos na amostragem de cigarrinhas em campo, cujas primeiras ninfas foram coletadas no mês de fevereiro, e o pico populacional de ninfas ocorreu em junho de 2016 e abril de 2017 (Figura 1). Auad et al. (2011) registraram uma duração de até 196,4 dias de diapausa em ovos de *M. spectabilis*, enquanto Koller; Honer (1993) encontraram valores 330 dias para *Deois flovipicta* (Stal, 1854) e 300 dias para *Zulia entreriana* (Berg, 1879).

As ninfas geradas neste tipo de ovos (diapaúsicos) apresentaram-se vigorosas e produziram espuma tão logo foram transferidas para raízes da cana-de-açúcar. Dos 200 ovos armazenados, 45 eclodiram após 8 meses, representando um percentual de 22,5% de ovos viáveis em diapausa. Destaca-se então a capacidade de manutenção dessa espécie em campo, o que dificulta o manejo da praga, uma vez que mostra a capacidade do inseto de iniciar uma nova população, mesmo após um longo período de baixa umidade ao qual os ovos venham a ser submetidos. Deste modo, a viabilidade não foi totalmente comprometida, indicando grande resistência dos ovos de *M. spectabilis* a seca.

No tocante aos estádios de desenvolvimento de ovos de *M. spectabilis* foram observadas as seguintes características: nas primeiras 48 horas não foram observadas alterações no tamanho ou coloração dos ovos, esta, inicialmente

apresentava um tom claro de amarelo (Figura 2A). Posteriormente, observou-se o surgimento de uma mancha arredondada levemente avermelhada na parte anterior do ovo, que pode ser visualizada tanto ventralmente como dorsalmente (Figura 2A).

A mancha avermelhada tornou-se mais definida, com intensificação do tom de vermelho, e todos os ovos apresentaram essa marca até o quarto dia após a postura. Observou-se também um escurecimento de uma linha na parte frontal do ovo (Figura 2B), do ápice até a metade do ovo, a linha de eclosão, uma sutura, esta linha mostra o tom da estrutura que está localizada abaixo da linha, o opérculo, no quinto dia e 64% dos ovos a apresentavam (Figura 2C). No sexto dia, observou-se o início da abertura da linha de eclosão com exposição do opérculo (Figura 2D), esta estrutura ficou completamente exposta no nono dia após postura (Figura 2E). No oitavo dia observou-se a formação de outra mancha arredondada na porção ventral, posterior do ovo, essa mancha marca o abdome do embrião, logo após, os olhos da ninfa caracterizado por duas manchas avermelhadas na parte anterior do ovo ficam evidenciados (9º dia) (Figura 2F e 2G).



**Figura 2** Fases do período embrionário de *Mahanarva spectabilis*: A- fase 1; B e C – fase 2; D e E – fase 3; F e G – fase 4.

Aos 12 dias após postura, 17% dos ovos não apresentaram as mudanças morfológicas acima mencionadas, oito destes, exibiram coloração escurecida ou aparentemente vazios, considerados assim ovos inviáveis.

A primeira eclosão ocorreu 12 dias após postura, sendo a última eclosão registrada 18 dias após postura; o período médio de incubação dos ovos foi  $14,5 \pm 1,9$  dias, com 83% dos ovos viáveis. Os ovos que até 30 dias após postura não eclodiram (9% do total), foram considerados em diapausa, critério estabelecido por Castro et al. (2005), sendo o leve escurecimento da linha de eclosão o último processo morfológico registrado e iniciado a diapausa. A ausência de manchas até o 11º dia após postura, pode ser considerado como indício de ovos em diapausa (Figura 3).



**Figura 3** Ovos de *Mahanarva spectabilis* em diapausa 12 dias após a postura.

Observou-se então quatro fases de desenvolvimento dos ovos de *M. spectabilis*: F1: a primeira fase, pode ser definida do período da postura ao surgimento das manchas avermelhadas na parte anterior dos ovos (Figura 2A); F2: segunda fase caracterizada pelo escurecimento da linha de eclosão refletindo o opérculo localizado abaixo desta (Figuras 2B e 2C); F3: a abertura desta linha e a exposição do opérculo caracterizam a terceira fase (Figuras 2D e 2E); F4: quarta fase tem início quando o embrião exibe manchas vermelhas na região do abdome e da parte superior dos ovos (marca os olhos do embrião). Ovos em diapausa não chegam a entrar na F3, sendo a F2 o último estágio antes da entrada em tal processo fisiológico.

Chaves et al. (2014) identificaram quatro fases durante o período embrionário de *M. indentata*, bem similar aos encontrados para *M. spectabilis* neste estudo, com a diferença da primeira fase ser distinguida pelo escurecimento da linha de eclosão. *Aneolamia flavilatera* e *A. lepidior* também exibem as mesmas fases, com poucas distinções (PECK, 2002). Os dados para cigarrinhas do gênero *Zulia* encontrados por Rodrigues et al. (2002) também corroboram com os dados deste estudo, visto que todos esses trabalhos sugerem que os ovos de cercopídeos passam por processo de desenvolvimento embrionário bastante semelhante. As fases do período embrionário de cigarrinhas foram primeiramente descritas por Wiedijk (1982), e tem sido usado como base para estudos de biologia de várias espécies de cercopídeos.

O tamanho e largura dos ovos entre as fases de desenvolvimento definidas, mostraram diferenças significativas (Tabela 2). Houve aumento em tamanho e largura dos ovos com o passar das fases, incremento justificado provavelmente à absorção de água ao longo do desenvolvimento (PECK, 2002)

**Tabela 2** Médias de comprimento e largura (mm) de ovos de *M. spectabilis* durante as fases de desenvolvimento embrionário

|              | Fases de Desenvolvimento Embrionário |         |         |         |
|--------------|--------------------------------------|---------|---------|---------|
|              | 1                                    | 2       | 3       | 4       |
| Comprimento* | 1,168 c                              | 1,202 b | 1,207 b | 1,258 a |
| Largura**    | 0,324 a                              | 0,360 b | 0,385 c | 0,399 c |

\*médias com a mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% ( $p < .01$ ). \*\* médias com a mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis a 5% ( $p < 0.05$ ).

A média de comprimento dos ovos de *M. spectabilis* registrada foi de 1,209 mm, e 0,367 mm de largura, valores bem próximos aos registrados por Chaves et al. (2014) e Peck (2002) para *M. indentata* e *M. andigena* respectivamente.

### 4.3 CONCLUSÕES

*Mahanarva spectabilis* apresenta picos populacionais logo após a incidência das chuvas.

A diapausa em ovos de *M. spectabilis* tem duração de 240 dias.

O desenvolvimento embrionário apresenta quatro fases distintas, onde os ovos entram em diapausa na segunda fase de desenvolvimento.

### REFERÊNCIAS

ALVES, R. T.; CARVALHO, G. S. First record of the sugarcane froghoppers *Mahanarva spectabilis* (Distant) and *Mahanarva liturata* (Le Peletier & Serville) infesting sugarcane plantations in the region of Goianésia (GO), Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 83-85, 2014.

AUAD, A. M.; SIMÕES, A. D.; VANDER PEREIRA, A.; BRAGA, A. L. F.; SOBRINHO, F. S.; DA SILVA LÉDO, F. J.; PAULA-MORAES, S.V.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, R. B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1077-1081, 2007.

AUAD, A. M.; SIMOES, A. D.; LEITE M. V.; SILVA S. E. B.; SANTOS, D. R.; MONTEIRO, P. H. Seasonal dynamics of egg diapause in *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) on elephant grass. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.2, p.325-330, 2011.

BARBOSA, R.H.; KASSAB, S.O.; COLMAN, B.A.; PERREIRA, F.F.; SILVA, A.S.. Influência de fatores abióticos na infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Comunicata Scientiae**, v.5, n.4, p.524-527, 2014.

BERNARDO, E.R.A.; ROCHA, V.F.; PUGA, O.; SILVA, R.A.. Espécies de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) no meio-norte do Mato Grosso. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 369-371, 2003.

CARVALHO, G.; WEBB, M.2005. **Cercopid spittlebugs of the New World (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cercopidae)**. Pensoft Publishers Sofia-Moscow. 2005, 280 pg.

CASTRO, U.; MORALES, A.; PECK, D.C. Dinámica poblacional y fenología del salivazo de los pastos *Zulia carbonaria* (Lallemand) (Homoptera: Cercopidae) em el valle geográfico del Río Cauca, Colombia. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 3, p. 459-470, 2005.

CHAVES, V. D. V.; PIMENTEL, G. V.; VALVERDE, A. H. P.; SILVA, L. A.; BARBOSA, M. H. P., PETERNELLI, L. A.. Biology and preferred oviposition site of the *Mahanarva indentata* froghopper (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. **Florida entomologist**, v.97, n. 1, p.73-79, 2014.

CRUZ, I.; CORRÊA, M.L.; GONTIJO-NETO, M.M.; SILVA, R.B.. Danos da cigarrinha-das-pastagens, *Deois flavopicta* Stål (Homoptera: Cercopidae) em milho consorciado com braquiárias. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. **Circular técnica**. 2010.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A.; FERREIRA, J. M.; GARCIA JR, C. A.; COELHO, Á. L.; GIL, M. A.. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål)(Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Neotropical entomology**, v.33, n.6, p.743-7494, 2004.

DINARDO-MIRANDA, L. L.. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L., VASCONCELOS, A. C. M., LANDELL, M. G. A. [ed.] **Cana-de-Açúcar**. IAC, São Paulo. pp. 349-404, 2008.

FERREIRA, E.; BARRIGOSI, J.A. F.; CASTRO, E. DA M.. **Homópteros associados ao arroz**. Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E). 2003.

GARCIA, J.F.; BOTELHO P.S.M.; PARRA J.R.P.. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agricola**, v.63, n. 4, p.317-320, 2006.

KASSAB, S. O.; LOUREIRO, E. S.; BARBOSA, R. H.; DA FONSECA, P. R. B.; MOTA, T. A.; ROSSONI, C.. Alteração no método de amostragem de *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hem.: Cercopidae) e avaliação da eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hyp.: Clavicipitaceae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 621-625, 2012.

KOLLER, W.W.; HONER, M.R.. Correlações entre fatores climáticos e a dinâmica de produção de ovos diapáusicos de duas espécies de cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera; Cercopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.22, n. 3, p.597-612, 1993.

LOHMANN, T. R.; PIETROWSKI, V.; BRESSAN, D. F.. Flutuação populacional de cigarrinhas-das-pastagens na região Oeste do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, p. 1291-1298, 2010.

MADALENO, L.L.; RAVANELI, G.C.; PRESOTTI, L.E.; MUTTON, M.A.; FERNANDES, O.A.; MUTTON, M.J.R.. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. **Neotropical entomology**, v. 37, n. 1, p. 68-73, 2008.

MARQUES, E. J.; LIMA, R. O. R.; OLIVEIRA, J. V.. **Pragas da cana-de-açúcar: nordeste do Brasil**. Recife: EDUFRPE.2009, 54 p.

MARTINS, R. P.; BARBEITOS, M. S.. Adaptações de insetos e mudanças no ambiente: Ecologia e evolução da diapausa. Ecologia e comportamento de insetos. **Série Oecologia Brasiliensis**, v.8, p.149-192, 2000.

MORALES, J.. Egg diapause and pest management of *Aeneolamia varia* (Homoptera Cercopidae) in Venezuela. **Environmental Entomology**, v.22, n.5, p.1092-1095, 1993.

PALADINI, A.; DOMAHOVSKI, A. C.; KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A. Reports of new wing color polymorphism and taxonomic information to cercopids (Auchenorrhyncha: Cercopidae) from upland rice crop, Pará State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 728-735, 2018.

PECK, D. C.. Distribución y reconocimiento del salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en la Costa Caribe de Colombia. **Pasturas tropicales**, Colombia, v.24, p.4 – 16, 2002.

RODRÍGUEZ, J.C.; PECK, J.; DC CANAL, N.. Biología comparada de tres especies de salivazo de los pastos del genero *Zulia* (Homoptera: Cercopidae). **Revista Colombiana de Entomología** (Bogota) v. 28, n.1, p. 17-25, 2002.

SANTOS, J.P.; CRUZ, I.; BOTELHO, W.. Avaliação de dano e controle da cigarrinha-das-pastagens em plantas de milho com diferentes idades. Sete Lagoas: **EMBRAPA/ CNPMS**, 1982, 9p.

SAS Institute. User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC. 2001.

SIMÕES, A. D.; LIMA, E. R.; AUAD, A. M.; RESENDE, T. T.; LEITE, M. V.. Development of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* under varying photophase conditions. **Journal of insect science**, v. 13, n. 1, p.1-11, 2013.

SUJII, E. R.; GARCIA, M. A.; FONTES, E. M. G.; DA SILVA, S. M. B.; MEYER, J. F. C. A.. SOIL temperature and diapause maintenance in eggs of the spittlebug, *Deois flavopicta* (Hemiptera: Cercopidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 605-613, 2001.

WIEDIJK, F. **Variability in the occurrence of the sugar cane froghopper *Aeneolamia flavilatera* (Homoptera: Cercopidae), on sugar estates in Guyana and Surinam**. 1982. 66f. Tese de Doutorado - Mededlingen Landbouwhogeschool Wageningen, Holanda, 1982.

## 5 CAPITULO III

**Caracterização de uma nova linhagem do complexo *Metarhizium anisopliae***

## RESUMO

*Mahanarva spectabilis* tem sido relatada atacando extensas áreas de canaviais, indicando que esta espécie apresenta grande potencial para se tornar praga para a cultura. Fungos do gênero *Metarhizium* são utilizados com sucesso no controle de diversos insetos, especialmente cigarrinhas. *Metarhizium* é um fungo cosmopolita que apresenta diversas espécies filogenéticas. Cujos isolados apresentam virulência variada a espécies de insetos pragas. Assim, este estudo foi realizado com o objetivo de identificar isolados do complexo *Metarhizium anisopliae* com potencial de uso no controle biológico da cigarrinha *M. spectabilis*. Foram obtidos isolados do complexo *M. anisopliae* de diferentes hospedeiros e diferentes regiões geográficas. Extraiu-se DNA dos isolados, em seguida amplificou-se e sequenciou-se as regiões TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, RPB1 e RPB2 e realizou a análise filogenética. Para caracterização morfológica os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo B.D.A. e foram incubadas em BOD. Para patogenicidade, inoculou suspensão de conídios com concentração padronizada de  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL sobre ninfas de *M. spectabilis*. De acordo com análise filogenética de sequências de quatro regiões genicas, observou que os isolados deste estudo formaram um clado irmão de *M. anisopliae*. Os caracteres morfológicos são semelhantes aos apresentados pela espécie *M. anisopliae*. Os isolados apresentaram diferentes níveis de virulência a *M. spectabilis*. Os isolados avaliados neste estudo representam uma nova linhagem filogenética do complexo *M. anisopliae* e todos apresentaram-se patogênicos a *M. spectabilis*.

Palavras-Chave: Diversidade genética, Controle microbiano, filogenia, identificação

## Characterization of a new strain of *Metarhizium anisopliae* complex

### ABSTRACT

*Mahanarva spectabilis* has been reported attacking extensive areas of cane fields, indicating that this species has great potential to become Pest for culture. Fungi of the genus *Metarhizium* are used with success in the control of various insects, especially spittlebug. *Metarhizium* fungus is a cosmopolitan city that has several phylogenetic species. Whose isolated feature varied virulence to species of insect pests. Thus, this study was conducted to identify complex isolates *Metarhizium anisopliae* with potential use in biological control of spittlebug *M. spectabilis*. Were obtained isolates of *M. anisopliae* complex of different hosts and different geographic regions. Extracted DNA from isolates, then amplified and sequenced the TEF-1 regions  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin RPB1 and RPB2, and phylogenetic analysis. For morphological characterization the isolates were grown in Petri dishes containing B.D.A. and were incubated in BOD. For pathogenicity, inoculated with conidia suspension standardized concentration  $1.0 \times 10^9$  conidia/mL on nymphs of *M. spectabilis*. According to phylogenetic analysis of sequences of four genicas regions, noted that the isolates in this study formed a clade brother of *M. anisopliae*. The morphological characters are similar to those presented by the species *M. anisopliae*. The isolates showed different levels of virulence to *M. spectabilis*. The isolates assessed in this study represent a new phylogenetic lineage of *M. anisopliae* complex and all were pathogenic to *M. spectabilis*.

Key-Words: Genetic diversity, Microbial control, phylogeny, identification.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo esta, uma das principais culturas que compõe o agronegócio brasileiro (CONAB, 2017). Cultivada em todas as regiões do país, a produção nacional em 2016 alcançou 768,7 milhões de toneladas, sendo destinada, principalmente, à produção de açúcar e etanol (IBGE, 2016).

Cigarrinhas do gênero *Mahanarva* frequentemente tem ocasionado danos à cana-de-açúcar. Esses danos são resultantes da alimentação de ninfas e adultos, que succionam a seiva das plantas, comprometendo o transporte de água e nutrientes para a parte aérea, além de injetar toxinas nas folhas que irão reduzir a capacidade fotossintética da planta, conseqüentemente, promovendo perdas significativas em produtividade e qualidade tecnológica (GARCIA et al., 2007; MADALENO et al., 2008; MARQUES; LIMA; OLIVEIRA, 2009)

Atualmente, a espécie *Mahanarva spectabilis*, cigarrinha considerada fator limitante ao desenvolvimento de pastagens, tem sido relatada atacando canaviais em vários estados brasileiros, indicando que esta espécie apresenta grande potencial para se tornar uma importante praga para a cultura. (ALVES; CARVALHO, 2014; DINARDO-MIRANDA, 2014). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo esta, uma das principais culturas que compõe o agronegócio brasileiro (CONAB, 2017). Cultivada em todas as regiões do país, a produção nacional em 2016 alcançou 768,7 milhões de toneladas, sendo destinada, principalmente, à produção de açúcar e etanol (IBGE, 2016).

Cigarrinhas do gênero *Mahanarva* frequentemente tem ocasionado danos em lavouras de cana-de-açúcar. Esses danos são resultantes da alimentação de ninfas e adultos, que sugam a seiva do tecido das plantas, comprometendo o transporte de água e nutrientes para a parte aérea, além de injetar toxinas nas folhas reduzindo a capacidade fotossintética da planta, conseqüentemente, promovendo perdas significativas em produtividade e qualidade tecnológica (GARCIA et al., 2007; MADALENO et al., 2008; MARQUES; LIMA; OLIVEIRA, 2009)

Atualmente, *M. spectabilis*, considerada é um fator limitante ao desenvolvimento de pastagens, tendo sido relatada atacando canaviais em vários estados brasileiros, indicando que esta espécie apresenta grande potencial para se

tornar uma importante praga para a cultura (ALVES; CARVALHO, 2014; DINARDO-MIRANDA, 2014).

Fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* têm sido utilizados com frequência no controle de cigarrinhas do gênero *Mahanarva*. Esse gênero cosmopolita é associado a uma ampla gama de hospedeiros e causa morte destes por meio da penetração e colonização de seus corpos (SMALL; BIDOCHKA, 2005; TULLOCH, 1976). O primeiro registro desse fungo foi realizado em 1879, por Metschnikoff, como patógeno de *Anisoplia austriaca* (Herbert, 1783) (Coleoptera: Scarabaeidae), uma importante praga de trigo na Rússia. Em 1976, Tulloch, baseado no estudo das características morfológicas como estruturas conidiogênicas, tamanho, cor e formato de conídios admitiu duas espécies: *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *M. flavoviride* (Gams & Rozsypal, 1973), bem como duas variedades dentro de *M. anisopliae* diferenciadas entre si pelo tamanho dos conídios, variedade *anisopliae* e variedade *major*. Várias espécies e variedades foram sendo identificadas ao redor do mundo provenientes de diferentes hospedeiros, logo as características morfológicas se provaram limitadas para identificação de espécies deste grupo. A partir de então, avanços nos estudos de biologia molecular com sequenciamento de regiões gênicas e isolados, têm permitido a reorganização do gênero, mostrando-se eficiente para discriminação de novas espécies, variedades e espécies crípticas presentes nesse complexo (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2006; BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009; LOPES et al., 2018).

O sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer) permite a identificação de espécies e variedades dentro do complexo *M. anisopliae*, no entanto, esta região não oferece suporte para separação de espécies crípticas (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2006). Para isso, análises filogenéticas inferidas a partir de sequenciamento de várias regiões do DNA têm apresentado resultados mais sensíveis e confiáveis, sendo atualmente a principal ferramenta usada para elucidar a taxonomia de linhagens de *Metarhizium* (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009). O sequenciamento das regiões do Fator de alongação (TEF-1 $\alpha$ ), Beta tubulina ( $\beta$ -tubulina), subunidades de RNA polimerase (RPB1 e RPB2) permitem um alto grau de diferenciação entre isolados de *Metarhizium*, sendo que a região 5' do fator de alongação mostra-se mais informativa que as outras regiões, sendo a mais recomendada para diferenciação de espécies

nesse gênero (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009; HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ; GUZMÁN-FRANCO, 2017; STEINWENDER et al., 2014). Para este fim, também foram desenvolvidos marcadores nucleares intergênicos, que ainda auxiliam na investigação de variabilidade intraespecífica de *M. anisopliae* apresentando resolução equivalente ou superior a fornecida pela região 5' do fator de alongação (KEPLER; REHNER, 2013; REHNER; KEPLER, 2017)

A variabilidade genética encontrada no complexo *M. anisopliae* também é expressa na patogenicidade e virulência que estes isolados apresentam quando utilizados no controle de pragas (SEPÚLVEDA et al., 2016). Grandes variações nos níveis de mortalidade são encontradas quando pragas são submetidas a controle por isolados do complexo, certamente devido a região geográfica ou origem do substrato, portanto, esse é mais um fato que ressalta a importância de estudos de caracterização genética e morfológica de isolados deste gênero de fungo (FREITAS et al., 2012; LOUREIRO et al., 2005; MACEDO; ALVES; VIEIRA, 2006; RODHE et al., 2006).

Dessa forma, o conhecimento da diversidade genética associada a patogenicidade de isolados de *Metarhizium*, se tornam uma etapa fundamental para implementação do controle biológico com patógeno. Assim, realizou-se este estudo com o objetivo de conhecer as espécies do complexo *M. anisopliae* com potencial de utilização no controle biológico da cigarrinha das pastagens *M. spectabilis*.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Caracterização morfológica e filogenética de isolados de *M. anisopliae***

#### **5.2.1.1 Obtenção dos isolados**

Foram obtidos isolados de *Metarhizium anisopliae* de diferentes estados brasileiros. Dois isolados foram adquiridos junto à Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu", Laboratório de Controle Biológico, Centro Experimental do Instituto Biológico de São Paulo (IBCB). Dois de Alagoas, sendo um cedido pela empresa de Controle Biológico Fitoagro (São Miguel dos Campos) e o outro coletado em canavial no município de Rio Largo parasitando cigarrinhas. Um do estado do Maranhão, que foi fornecido pela fazenda Agrosserra, proveniente do município de São Raimundo das Mangabeiras. O grupo Olho d'água,

localizado em Camutanga-PE, forneceu um isolado, e do Piauí, Teresina, um isolado foi encontrado parasitando moscas do gênero *Anastrepha* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Isolados de *Metarhizium* sp. testados para o controle de *M. spectabilis*.

| Identificação   | ISOLADO                | HOSPEDEIRO/<br>SUBSTRATO                 | ORIGEM                            |
|-----------------|------------------------|--|-----------------------------------|
| JD01            | <i>Metarhizium</i> sp. | Desconhecido                             | São Raimundo das Mangabeiras – MA |
| JD02            | <i>Metarhizium</i> sp. | <i>Mahanarva posticata</i>               | Camutanga – PE                    |
| JD04            | <i>Metarhizium</i> sp. | <i>M. fimbriolata</i>                    | Rio Largo – AL                    |
| JD05            | <i>Metarhizium</i> sp. | <i>M. fimbriolata</i>                    | São Miguel dos Campos – AL        |
| JD13            | <i>Metarhizium</i> sp. | <i>Anastrepha alveata</i><br>Stone, 1942 | Teresina – PI                     |
| JD21 (IBCB 425) | <i>M. anisopliae</i>   | Solo                                     | Iporanga – SP                     |
| JD22 (IBCB348)  | <i>M. anisopliae</i>   | <i>M. fimbriolata</i>                    | Sertãozinho – SP                  |

Os insetos parasitados por micélio de coloração verde foram encaminhados ao Laboratório. Com auxílio de uma seringa metálica estéril, estrutura do fungo foi transferido para placa contendo BDA. Em seguida as placas foram incubadas em câmara BOD a 25±1°C. Após o crescimento os fungos foram transferidos para microtubos e os mesmos foram armazenados em geladeira (RODRIGUES; LOUREIRO, 2009).

### 5.2.1.2 Caracterização morfológica

Os isolados foram caracterizados quanto à morfologia da colônia e análise das microestruturas como hifas e conídios. Para tanto os isolados foram cultivados em placas de Petri e em lâminas (micro-cultura) contendo meio de cultura B.D.A. Ambos foram incubados em BOD 25±1°C, 70-80% umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas. Conídios dos isolados foram transferidos para o meio de cultura tanto nas placas de Petri, quanto para as lâminas contendo meio de cultura solidificado. As lâminas foram recobertas por lamínulas e acondicionados em placas de Petri contendo um chumaço de algodão umedecido com água destilada, ambos esterilizados, simulando uma câmara úmida. As características morfológicas dos isolados foram observadas em microscópio óptico option (aumento 100x), após 24 horas de inoculação para as lamínula e 5 dias para as placas de Petri (VIEIRA et al., 2009; INGLIS et al., 2008).

Os conídios provenientes das culturas crescidas em placa de Petri foram suspensos em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80 a 0,01% e

posteriormente foram montadas preparações microscópicas. A partir destas, foram obtidas imagens dos conídios e hifas, capturadas através do microscópio óptico com câmera digital Tucsen acoplada e com auxílio do software Tsview 6.13.2, onde foram realizadas as mensurações do comprimento e largura de 20 conídios de cada isolado através do programa MicroMeasure.3.3.0.

### 5.2.1.3 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

A extração do DNA dos isolados foi realizada de acordo com método CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) descrito por Doyle e Doyle (1991) a partir do micélio dos fungos cultivados em meio BD enriquecido (Batata 200 g/L, Dextrose 10g/L, Extrato de levedura 2g/L, Peptona 2g/L, Caseína 1,5g/L) e triturado em microtubos com auxílio de pistilo de plástico, quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo) e a integridade visualizada em gel de agarose 0,8%. O DNA extraído foi submetido à reação em cadeia de polimerase (PCR) para a amplificação do gene codificador do fator de alongação da tradução 1 $\alpha$  (TEF), gene codificador da  $\beta$ -tubulina, RPB1 (RNA polymerase II largest subunit) e RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit). Os oligonucleotídeos iniciadores para o fator de alongação foram tef71F (5' – CAAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC– 3') e tef997R (5' – CAGTACCGGCRGCRATRATSAG – 3') (SHOUKOUHI; BISSETT, 2009) e para a  $\beta$ -tubulina foram TUB2FD (5' – GTBCACCTYCARACCGGYCARTG – 3') e TUB4RD (5' – CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC – 3') (AVESKAMP et al., 2009); os iniciadores para o primer RPB1 foram RPB1Af (59- GARTGYCCDGGDCAITTYGG) e RPB1: RPB1-VH6Fa (CAYAARGARTCYATGATGGGWC), RPB1-G2R (GTCATYTGDTGDCDGGYTCDCC); RPB2: fRPB2-7Cf (ATGGGYAARCAAGCYATGGG), fRPB2-11aR (GCRTGGATCTTRTCRTCSACC), RPB2-5F2 (GGGGWGAYCAGAAGAAGGC) e fRPB2-7cR (CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT) (LIU; WHELEN; HALL, 1999).

As reações de PCR foram realizadas utilizando 150 ng do DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 mM de dNTPs e uma unidade de Taq DNA Polimerase (DNA Express) para um volume final de 25  $\mu$ L. As condições de PCR para todas as regiões foram desnaturação inicial de 95 °C/3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C/1 min, anelamento de 60 95 °C/1 min, extensão de 72 °C/1 min e extensão final a 72 °C/10 min. Os amplicons gerados foram visualizados

em gel de agarose e os tamanhos mensurados com auxílio do marcador 1kb (Invitrogen).

Os produtos de PCR foram tratados com Polietilenoglicol (PEG 20%) (SCHMITZ; RIESNER, 2006), e sequenciadas pelo método Sanger, usando o kit BigDye™ Terminator v3.1, no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) no modo standard. A sequência consenso das fitas F e R para cada região foi obtida com auxílio do programa DNA baser assembly (<http://www.dnabaser.com/>).

#### **5.2.1.4 Alinhamento e análise filogenética**

As sequências de nucleotídeos foram editadas usando SeqAssem (HEPPERLE, 2004). Sequências adicionais de isolados de *M. anisopliae* de diferentes hospedeiros foram obtidos do GenBank (Tabela 2). As sequências foram alinhadas usando o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994), implementadas pelo software MEGA v.6 (TAMURA et al., 2011). Bem como as sequencias foram comparadas, através do programa MEGA v.5, com o material de referência (*M. anisopliae* -ARSEF 7487), a fim de observar os sítios conservados.

Análises de inferência Bayesiana concatenadas foram realizadas com todas as sequências empregando o método de cadeias Monte Carlo (MCMCMC). O Mr Modeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) foi usado para determinar o modelo de evolução dos nucleotídeos que melhor se ajustou aos dados. A análise filogenética foi realizada no CIPRES web portal (MILLER et al., 2010) usando a versão MrBayes v.3.2. (RONQUIST et al., 2012). Cadeias de Markov foram executadas simultaneamente, a partir de árvores aleatórias para 10.000.000 gerações. Árvores foram amostradas cada 1000 gerações para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como burn-in de cada análise e as 7.500 árvores restantes foram utilizadas para o cálculo das probabilidades posteriores dos ramos, determinados pelo consenso de maioria das árvores amostradas. Árvores foram visualizadas em Figtree (RAMBAUT, 2009) e exportadas para programas gráficos. Nesta análise, isolados de *M. frigidium* e *M. globosum* foram utilizados como outgroups. Os isolados coletados estão depositados no laboratório de entomologia da Universidade Federal do Piauí.

**Tabela 2** Isolados de *Metarhizium* spp. utilizados na análise filogenética com seus respectivos hospedeiros, país de origem e Código e números de acesso no GenBank.

| Espécie                          | Hospedeiro/substrato | País            | Codigo        | Número de acesso no GenBank |          |          |          |
|----------------------------------|----------------------|-----------------|---------------|-----------------------------|----------|----------|----------|
|                                  |                      |                 |               | EF1-alfa                    | Beta-tub | RPB1     | RPB2     |
| <i>Metarhizium robertsii</i>     | -                    | Australia       | ARSEF 7501    | EU248849                    | EU248818 | EU248901 | EU248929 |
| <i>Metarhizium robertsii</i>     | Orthoptera           | Brasil          | ARSEF 727     | DQ463994                    | EU248816 | DQ468353 | DQ468368 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i>    | Coleoptera           | Australia       | ARSEF 7450    | EU248852                    | EU248823 | EU248904 | EU248932 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> *  | Orthoptera           | Eritrea         | ARSEF 7487 ET | DQ463996                    | EU248822 | DQ468355 | DQ468370 |
| <i>Metarhizium pingshaense</i> * | Coleoptera           | China           | CBS 257.90 ET | EU248850                    | EU248820 | EU248902 | EU248930 |
| <i>Metarhizium pingshaense</i>   | Coleoptera           | Solomon Islands | ARSEF 4342    | EU248851                    | EU248821 | EU248903 | EU248931 |
| <i>Metarhizium alvesii</i>       | Solo                 | Brasil          | CG1123        | KY007614                    | KY007611 | KY007612 | KY007613 |
| <i>Metarhizium brunneum</i> *    | Coleoptera           | USA             | ARSEF 2107 ET | EU248855                    | EU248826 | EU248907 | EU248935 |
| <i>Metarhizium brunneum</i>      | Solo                 | Australia       | ARSEF 4179    | EU248854                    | EU248825 | EU248906 | EU248934 |
| <i>Metarhizium lepidiotae</i> *  | Coleoptera           | Australia       | ARSEF 7488 ET | EU248865                    | EU248837 | EU248917 | EU248945 |
| <i>Metarhizium lepidiotae</i>    | Coleoptera           | Australia       | ARSEF 7412    | EU248864                    | EU248836 | EU248916 | EU248944 |
| <i>Metarhizium guizhouense</i> * | Lepidoptera          | China           | CBS 258.90 ET | EU248862                    | EU248834 | EU248914 | EU248942 |
| <i>Metarhizium guizhouense</i>   | Lepidoptera          | China           | ARSEF 6238    | EU248857                    | EU248830 | EU248909 | EU248937 |
| <i>Metarhizium indigoticum</i>   | Lepidoptera          | Japan           | NBRC 100684   | KJ398784                    | KJ398544 | KJ398544 | KJ398692 |
| <i>Metarhizium acridum</i> *     | Orthoptera           | Niger           | ARSEF 7486 ET | EU248845                    | EU248813 | EU248897 | EU248925 |
| <i>Metarhizium acridum</i>       | Orthoptera           | Australia       | ARSEF 324     | EU248844                    | EU248812 | EU248896 | EU248924 |
| <i>Metarhizium majus</i> *       | Coleoptera           | Philippines     | ARSEF 1914 ET | EU248868                    | EU248840 | EU248920 | EU248948 |
| <i>Metarhizium majus</i>         | Coleoptera           | Philippines     | ARSEF 1946    | EU248867                    | EU248839 | EU248919 | EU248947 |
| <i>Metarhizium globosum</i>      | Lepidoptera          | India           | ARSEF 2596    | EU248846                    | EU248814 | EU248898 | EU248926 |
| <i>Metarhizium frigidium</i> *   | Coleoptera           | Australia       | ARSEF 4124 ET | DQ464002                    | EU248828 | DQ468361 | DQ468376 |

\* Isolados "ex-type"

## 5.2.3 Testes de Patogenicidade

### 5.2.3.1 Obtenção e criação de *M. spectabilis*

Adultos de *M. spectabilis* foram capturados em cultivo comercial de cana-de-açúcar (pertencente ao grupo Olho D'água) no município de União, Piauí (04° 51' 08" S e 42° 52' 59" W). Estes foram acondicionados em gaiolas de madeira revestidas com tela contendo mudas de cana-de-açúcar plantadas em recipientes plásticos (500 mL) com 60 dias de idade e transportadas ao laboratório, onde foram utilizados para dar início a criação. Casais de adultos de cigarrinha foram isolados em gaiolas contendo mudas de cana. Cada muda recebeu envolto na base da planta um disco de algodão umedecido para ser utilizado como sítio de oviposição. Os ovos foram retirados diariamente com auxílio de estiletos e estereoscópio e mantidos em placas de Petri forradas com papel filtro úmidos com água destilada. Estes foram mantidos em câmara BOD até eclosão. Logo após a eclosão, as ninfas foram transferidas para raízes expostas de cana-de-açúcar, onde permaneceram até a realização dos testes de patogenicidade (Adaptada de GARCIA et al., 2007).

### 5.2.3.2 Bioensaio de Patogenicidade

Foram utilizadas 10 ninfas de cigarrinhas com 10 a 15 dias de idade por tratamento distribuídas em raízes expostas de mudas de cana-de-açúcar para aplicação dos isolados de *M. anisopliae*. Para cada isolado, com auxílio de câmara de Neubauer sob microscópio óptico, foram preparadas suspensões de conídios dos fungos cultivados em meio de cultura B.D.A. utilizando água destilada estéril e espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1%, com concentração padronizada de  $1,0 \times 10^9$  conídios/ml (FREITAS et al., 2012).

Em cada ninfa, com auxílio de borrifadores, inoculou-se 1mL da suspensão de esporos e uma solução contendo água destilada estéril e espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1% no tratamento testemunha. As mudas de cana contendo as cigarrinhas que receberam os tratamentos, foram cobertas com potes plásticos de 1 L recortados, de forma que somente a parte aérea da planta ficou exposta e foram mantidos na sala de criação com fotofase de 12 horas, temperatura média de  $29 \pm 2$  °C e Umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ .

Diariamente, até o sétimo dia após pulverização, avaliou-se a mortalidade das ninfas. Indivíduos mortos foram desinfestados com etanol 70% e, em seguida, imersos em hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, posteriormente repetindo-se a lavagem em água destilada estéril para a retirada do excesso de cloro. Em seguida, foram transferidos para placas de Petri contendo fragmentos de algodão estéril úmido e mantidas em câmara climatizada à temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

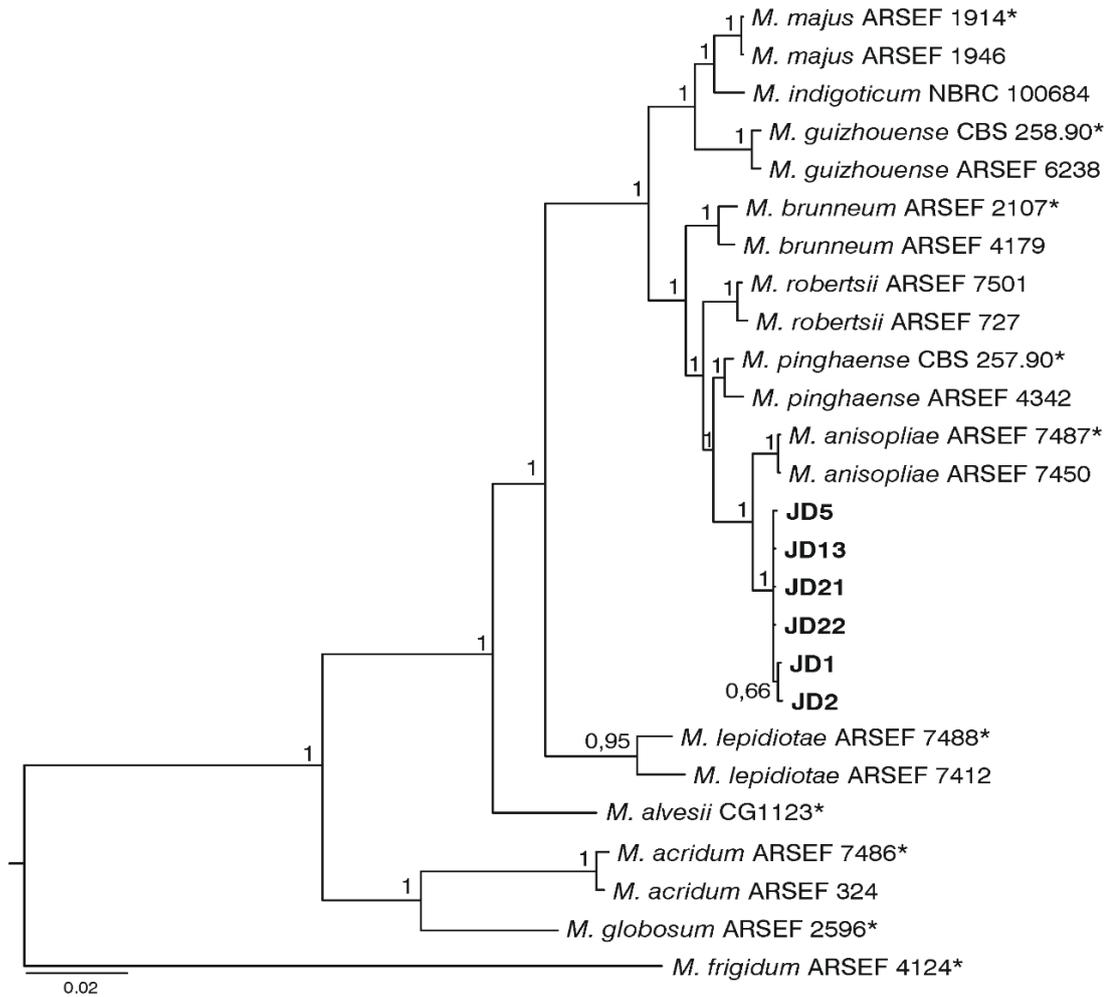
Foram coletados dados de mortalidade total, mortalidade confirmada e mortalidade corrigida calculados pela fórmula de Schneider-Orelli (Mortalidade corrigida =  $[(\% \text{ de mortalidade no tratamento} - \% \text{ mortalidade na testemunha}) / (100 - \% \text{ mortalidade na testemunha}) * 100]$ ), sete dias após inoculação (MACEDO; ALVES; VIEIRA, 2006). A partir dos dados de mortalidade determinou-se o tempo letal ( $TL_{50}$ ) empregando-se o Proc Probit, do programa estatístico SAS (SAS Institute, 2004).

O delineamento foi o inteiramente casualizado, com oito tratamentos, sendo sete isolados de *Metarhizium* mais a testemunha, com 10 repetições, sendo selecionado os isolados que apresentaram maiores valores de mortalidade corrigida.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Análises filogenéticas

A análise filogenética de inferência bayesiana das sequências das regiões TEF-1  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, RPB1 e RPB2 indica que os isolados estudados se agruparam em um clado separado de *M. anisopliae*, indicando que estes são geneticamente distintos das espécies do complexo *Metarhizium anisopliae*. A distância genética entre os clados, indica uma nova linhagem filogenética do complexo *M. anisopliae* (Figura 1).



**Figura 1** Análise filogenética inferência Bayesiana, concatenada com dados que inclui as sequências do fator de alongação EF-1,  $\beta$ -tubulina, RPB1 e RPB2 de isolados do complexo *Metarhizium anisopliae*. Valores do suporte estatísticos indicados acima dos internódios.

Diversas espécies do complexo *M. anisopliae* foram recentemente descritas. *Metharizium alvesii* Lopes, Faria, Montalva & Humber 2018, obtida de solo (LOPES et al., 2018), *Metarhizium baoshanense* Chen; Xu; Yang, Zhang & Yang 2018, também obtida de solo (CHEN et al., 2018) *Metarhizium kalasinense* Tسانathai, Khonsanit, Thanakitpipattana, Mongkolsamrit & Luangsa-ard 2017, *Metarhizium prachinense* Tسانathai, Khonsanit, Thanakitpipattana, Mongkolsamrit & Luangsa-ard 2017, *Metarhizium chaiyaphumense* Tسانathai, Khonsanit, Thanakitpipattana, Mongkolsamrit & Luangsa-ard 2017, *Metarhizium samlanense* Luangsa-ard, Thanakitpipattana, Tسانathai, Mongkolsamrit & Hywel-Jones 2017, *Metarhizium takense* Tسانathai, Thanakitpipattana, Mongkolsamrit & Luangsa-ard 2017, obtidas de solo e insetos mortos (LUANGSA-ARD et al., 2017).

Os isolados de *Metarhizium* sp. estudados possuem diferenças de nucleotídeos quando comparados com o isolado de referência *M. anisopliae* (ARSEF 7487). *Metarhizium anisopliae* s. strito (espécie tipo), observou-se que o gene TEF apresentou cinco nucleotídeos diferentes do isolado tipo, no RBP2 oito nucleotídeos diferentes do isolado tipo gene, no RBP1 um nucleotídeo diferente do isolado tipo e no gene  $\beta$ -tubulina sete nucleotídeos diferentes do isolado tipo (ANEXO I). Todos os isolados deste estudo formaram um grupo irmão de *M. anisopliae*, este estudo evidencia a importância da identificação de fungos, com o emprego de técnicas modernas de biologia molecular.

Existe uma grande dificuldade em realizar a distinção entre espécies do complexo *Metarhizium*, em função da grande similaridade morfológica dentro deste complexo, com a existência de várias espécies crípticas, sendo que atualmente somente caracteres morfológicos não são mais aceitos para fins de identificação (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2006).

Existe ampla diversidade de espécie do complexo *M. anisopliae*, obtido de diversos substratos. Estas espécies antigamente eram denominadas como *M. anisopliae* sensu lato (BISCHOFF et al., 2009). A diversidade de isolados caracterizados ao redor do mundo (América do Norte, Ásia e Europa) normalmente são agrupados em dois grandes clados, conhecidos como clado PARB e MGT (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009). Estes clados são formados pelas espécies mais comuns identificadas no mundo e oriundas das mais diversas espécies de hospedeiros e tipos de solo. O clado PARB é formado pelas espécies *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *Metarhizium robertsii* Bischoff; Rehner & Humber e *M. brunneum* (HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ; GUZMÁN-FRANCO, 2017; KEPLER et al., 2015; KEYSER et al., 2015; NISHI et al., 2011). O clado MGT é composto pelas espécies *Metarhizium majus* (Johnst.) Bischoff; Rehner & Humber, e *M. guizhouense* (= *Metarhizium taii*) (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009).

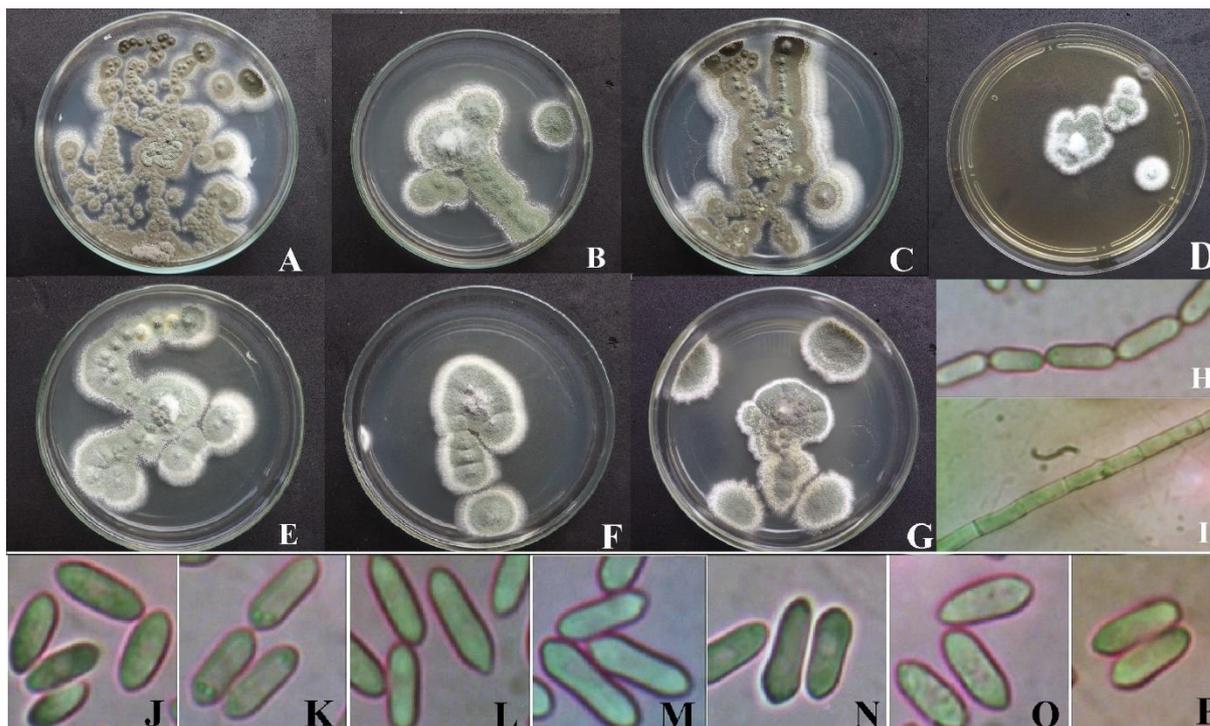
A maioria dos isolados brasileiros sequenciados até o momento têm sido posicionados dentro do grupo PARB (LOPES et al., 2013A; LOPES et al., 2013B; LOPES et al., 2014; REZENDE et al., 2015), porém, espécies menos comuns também têm sido identificadas, como *Metarhizium lepidiotae* (Driver & Milner) Bischoff; Rehner & Humber, 2009 (LOPES et al., 2013B; LOPES et al., 2014), *Metarhizium riley*, *Metarhizium flavoviride* var. *pemphigi* Driver & Milner 2000 (LOPES et al., 2014, ROCHA et al., 2013), *Metarhizium brasiliense* Kepler; Rehner & Humber, 2014

(KEPLER et al., 2014) e *Metarhizium acridum* (Driver & Milner) Bischoff; Rehner & Humber, 2009 (LOPES et al., 2014), além de novas espécies e linhagens dentro do complexo *M. anisopliae* como *M. alvesii*, com adição da espécie identificada neste estudo (LOPES et al., 2018; REZENDE, et al., 2015)

Os isolados utilizados comercialmente (IBCB425 e IBCB348), designadas neste estudo como JD21 e JD22, respectivamente, são utilizados como ingredientes ativos de diversas marcas comerciais no Brasil onde estão classificadas como *M. anisopliae* var. *anisopliae*, na verdade são representantes de uma nova espécie dentro do complexo *M. anisopliae*. No Brasil, existem 34 inseticidas microbiológicos registrados no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, todos com a espécie *M. anisopliae* identificada como ingrediente ativo e indicados para o controle de apenas três espécies de cigarrinhas, *Notozulia entreriana* (Berg, 1879), *Deois flavopicta* (Stal, 1954), *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (AGROFIT, 2019). Outras espécies do complexo também são utilizadas no controle de outras pragas pelo mundo. A exemplo *M. acridum* e *M. flavoviride*, para o controle de espécies como *Schistocerca gregaria* (Forsk, 1775) (Orthoptera: Acrididae), *Locustana pardalina* (Walker, 1980) (Orthoptera: Acrididae), *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Gelechiidae) entre outras, no entanto, o potencial de outras espécies do complexo e de novas espécies permanece desconhecido (SABBOUR, 2015; THOMAS et al., 2000).

### **5.3.2 Avaliação morfológica**

Todos os isolados de *Metarhizium* avaliados apresentaram padrão de crescimento similar com o crescimento inicial da colônia exibindo uma coloração branca tornando-se verde oliva tão logo os conídios fossem produzidos (Figura 2). Pode-se observar a produção de conídios em cadeias, bem como a formação de hifas septadas em todos os isolados (Figuras 2I e 2H).



**Figura 2** Colônias de *Metarhizium* sp.: A -JD01; B - JD02; C-JD04; D-JD05; E-JD13; F-JD21 (IBCB425); G-JD22(IBC 348), H-Cadeia de conídios e I-septos em hifas de *Metarhizium* sp.; Conídios de *Metarhizium* sp.; J-JD01; K-JD02; L-JD04; M-JD05; N-JD13; O-JD21(IBCB425); P-JD22 (IBC348).

Todas essas características são comuns a espécie *M. anisopliae*, que apresenta conídios cilíndricos ou ovoides, formando longas cadeias, com cores que variam entre amarelo-esverdeado, marrom, verde, verde-oliva, crescimento inicial da colônia apresentando micélio branco (CAMPAGNANI et al., 2017; HUMBER, 2012).

Foram produzidos conídios hialinos, cilíndricos com ápice cônico e coloração esverdeada característica de *M. anisopliae* (Figura 2) com média de comprimento variando de 3,80 (JD22) a 4,40 $\mu$ m (JD05) e largura variando de 1,40 (JD22) a 1,55 $\mu$ m (JD04) (Tabela 3). Esses valores ficam próximos a valores descritos para diversas espécies do complexo *M. anisopliae* (BISCHOF; REHNER; HUMBER, 2009; FERNANDES et al., 2010; SEPÚLVEDA et al., 2016). A avaliação da coloração da colônia e aspectos das culturas e dimensões de conídios têm sido utilizados como marcadores morfológicos para identificação de espécies do complexo *M. anisopliae*, no entanto, apenas avaliando estes parâmetros não fornece suporte confiável para identificação de espécies deste complexo. Desta forma as melhores ferramentas de identificação são metodologias que empregam estudos moleculares (STEINWENDER et al., 2014; NISHI et al., 2011).

**Tabela 3** Comprimento e largura (valores máximos, mínimos e médias) de conídios de isolados de *Metarhizium* sp. crescidos em BDA a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 70-80% umidade relativa e fotofase de 12 horas em Teresina, PI.

| Isolado | Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) |      |       | Largura ( $\mu\text{m}$ ) |      |       |
|---------|-------------------------------|------|-------|---------------------------|------|-------|
|         | Mín.                          | Máx. | Média | Mín.                      | Máx. | Média |
| JD01    | 3,66                          | 4,62 | 4,00  | 1,34                      | 1,65 | 1,49  |
| JD02    | 3,35                          | 4,64 | 3,88  | 1,31                      | 1,70 | 1,45  |
| JD04    | 3,97                          | 4,60 | 4,22  | 1,36                      | 1,76 | 1,55  |
| JD05    | 3,95                          | 5,35 | 4,40  | 1,37                      | 1,76 | 1,52  |
| JD13    | 3,57                          | 4,63 | 4,07  | 1,32                      | 1,74 | 1,48  |
| JD21    | 3,64                          | 6,08 | 4,28  | 1,29                      | 1,82 | 1,54  |
| JD22    | 3,48                          | 5,29 | 3,80  | 1,27                      | 1,58 | 1,40  |

### 5.3.3 Teste de patogenicidade

Todos os isolados avaliados foram patogênicos a ninfas de *M. spectabilis*. Os percentuais de mortalidade confirmada variaram de 20 a 70%, sendo o isolado JD13 o menos virulento e os isolados JD02, JD04 e JD22 (IBCB 348) os mais virulentos, provocando 70% de mortalidade confirmada (Tabela 4).

**Tabela 4.** Mortalidade confirmada, corrigida e tempo letal médio de diferentes isolados de *Metarhizium* sp. sobre ninfas de *M. spectabilis*.

| ISOLADOS       | Mortalidade Confirmada (%) | Mortalidade Corrigida (%) | TL <sub>50</sub> (dias) |
|----------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Testemunha     | 0                          | 0                         | 0                       |
| JD01           | 30                         | 25                        | 8,07                    |
| JD02           | 70                         | 62,5                      | 5,74                    |
| JD04           | 70                         | 100                       | 5,34                    |
| JD05           | 50                         | 62,5                      | 6,31                    |
| JD13           | 20                         | 12,5                      | 9,09                    |
| JD21 (IAC 425) | 60                         | 50                        | 5,17                    |
| JD22 (IAC 348) | 70                         | 75                        | 4,66                    |

A mortalidade corrigida apontou variações de 12,5 a 100% de mortalidade, provocada pelos isolados JD13 e JD04, respectivamente. O isolado JD13 provocou menor percentuais de mortalidade corrigida, associados a uma baixa virulência (TL<sub>50</sub> de 8,07 dias), sendo um isolado com baixo potencial para utilização no controle biológico de *M. spectabilis*. Os menores valores de TL<sub>50</sub> foram obtidos com os isolados JD21 e JD22 (5,17 e 4,66 dias, respectivamente) (Tabela 4), que são cepas comerciais

conhecidas como a espécie *M. anisopliae*. Campagnani et al. (2017) em trabalho pioneiro, confirmaram a patogenicidade de isolados selvagens do fungo *Metarhizium* a *M. spectabilis*, conseguindo alcançar níveis de mortalidade próximos ao deste estudo. Apesar de ainda não ser um método de controle reconhecido para *M. spectabilis*, o fungo *Metarhizium* tem se mostrado muito eficaz no controle de outras espécies de cigarrinhas, como *M. fimbriolata* e *M. posticata*, além de coleópteros e percevejos (MACEDO; ALVES; VIEIRA, 2006; FREITAS et al., 2012; MARTINS DA SILVA et al., 2004; RODHE et al., 2006).

O isolado JD13 foi obtido infectando insetos da ordem díptera (*A. alveata*), ordem que apresenta características morfológicas e fisiológicas bem distintas da ordem Hemiptera, e isto indica uma reduzida capacidade deste isolado de causar infecção em *M. spectabilis*. As maiores mortalidades foram obtidas em isolados cujo hospedeiros são insetos do mesmo gênero, JD02 isolado de *M. posticata*, JD04, JD05 e JD22 (IBCB 348) isolados de *M. fimbriolata*, que também apresentaram virulência similar (variando de 3,9 a 4,97 dias).

Essas variações podem ser justificadas por adaptações de determinados isolados a seus hospedeiros. Sinais específicos das estruturas físicas ou químicas da superfície da cutícula dos insetos funcionam como estímulo a capacidade de o fungo germinar e se desenvolver (WANG; LEGER, 2005). A composição das camadas da cutícula, que varia muito entre diferentes espécies de insetos também apresenta influencia na patogenicidade e virulência desses isolados, no entanto, *Metarhizium* pode se adaptar a essas cutículas, pois apresenta a capacidade de expressar genes relacionados à virulência em resposta a diferentes composições de cutículas, ou seja, a diferentes hospedeiros (FREIMOSER; HU; LEGER, 2005; PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007). O meio de cultura onde foi promovido o crescimento dos fungos, repicagens sucessivas em meios de cultura, aplicação de pesticidas são fatores que também apresentam influência sobre a patogenicidade e virulência de isolados de *Metarhizium* (MOCHI et al., 2006; SHAH; WANG; BUTT, 2005).

## 5.4 CONCLUSÕES

O sequenciamento das regiões do fator de alongação EF-1  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, RPB1 e RPB2 permitiram identificação de uma nova linhagem dentro do complexo *Metarhizium anisopliae*.

Todos os isolados foram patogênicos à cigarrinha *Mahanarva spectabilis*, entretanto com diferentes níveis de virulência.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, R. T.; CARVALHO, G. S. First record of the sugarcane froghoppers *Mahanarva spectabilis* (Distant) and *Mahanarva liturata* (Le Peletier & Serville) infesting sugarcane plantations in the region of Goianésia (GO), Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 83-85, 2014.
- AGROFTI. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 14/01/2019.
- AVESKAMP, M. M.; VERKLEY, G. J.; DE GRUYTER, J.; MURACE, M. A.; PERELLO, A.; WOUDEBERG, J. H.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P.W. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 363-382, 2009.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycologia**, v. 98, n. 5, p. 737-745, 2006.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009.
- CAMPAGNANI, M. O.; CAMPOS, W. G.; AMORIM, S. S.; ROSA, L. H., AUAD; A. M., CANGUSSÚ, M. A.; MAURÍCIO, R. M. Prospection and fungal virulence associated with *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) in an Amazon silvopastoral system. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 2, p. 426-432, 2017.
- CHEN, Z.; XU, L.; YANG, X.; ZHANG, Y.; YANG, Y. *Metarhizium baoshanense* sp. nov., a New Entomopathogen Fungus from Southwestern China. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 50, n. 5, p. 1739-1739, 2018.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Cana-de-Açúcar: Segundo Levantamento Safra 2016/07**. CONAB, 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_08\\_17\\_10\\_07\\_35\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_2o\\_lev\\_-\\_16-17.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_08_17_10_07_35_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_16-17.pdf)>. Acesso em 09 ago. 2017.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Nematoides e pragas da cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 101-167, 2014.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 1, 13-15, 1991.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, n. 2, p. 134-150, 2000.

FERNANDES, E. G.; DURÃES, L. D. S.; BORGES, M. A. S.; VALÉRIO, H. M. Isolamento e seleção de fungos para controle de larvas de terceiro ínstar de *Musca domestica*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 317-322, 2010

FREIMOSER, F. M.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. **Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 361-371, 2005.

FREITAS, A. F.; LOUREIRO, E. S.; DE ALMEIDA, M. E. B.; PESSOA, L. G. A. Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates for the control of *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, p. 247-254, 2012.

GARCIA, J.F., GRISOTO, E.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; GLÓRIA, B.A. Feeding site of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 5, p. 555-557, 2007.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, C.; GUZMÁN-FRANCO, A. W. Species diversity and population dynamics of entomopathogenic fungal species in the genus *Metarhizium*—a spatiotemporal study. **Microbial ecology**, v. 74, n. 1, p. 194-206, 2017.

HEPPERLE, D. SeqAssem©: Win32-Version. a sequence analysis tool containing assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. 2004 Available at: <http://www.sequentix.de>

HUMBER, R. A. Identification of entomopathogenic fungi. In: **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)**. 2012. p. 151-187.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**. IBGE, 2016.

Disponível em

<[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2015\\_v42\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2015_v42_br.pdf)> .

Acesso em 09 ago. 2017.

- INGLIS, G. D.; DUKE, G. M.; GOETTEL, M. S.; KABALUK, J. T. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 1, p. 101-113, 2008.
- KEPLER, R. M.; REHNER, S. A. Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Molecular ecology resources**, v. 13, n. 2, p. 210-217, 2013.
- Kepler, R. M.; Humber, R. A.; Bischoff, J. F.; Rehner, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 811-829, 2014.
- KEPLER, R. M.; UGINE, T. A.; MAUL, J. E.; CAVIGELLI, M. A.; REHNER, S. A.. Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 8, p. 2791-2804, 2015.
- KEYSER, C. A.; HENRIK, H.; STEINWENDER, B. M.; MEYLING, N. V.. Diversity within the entomopathogenic fungal species *Metarhizium flavoviride* associated with agricultural crops in Denmark. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 249, 2015.
- LIU, Y. J.; WHELEN, S.; HALL, B. D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 12, p. 1799-1808, 1999.
- LOPES, R. B.; MESQUITA, A. L. M.; TIGANO, M. S.; SOUZA, D. A.; MARTINS, I. FARIA, M. Diversity of indigenous *Beauveria* and *Metarhizium* spp. in a commercial banana field and their virulence toward *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Fungal Ecology**, v. 6, n. 5, p. 356-364, 2013A.
- LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; OLIVEIRA, C. M.; FARIA, M.. Genetic diversity and pathogenicity of *Metarhizium* spp. associated with the white grub *Phyllophaga capillata* (Blanchard)(Coleoptera: Melolonthidae) in a soybean field. **Neotropical entomology**, v. 42, n. 4, p. 436-438, 2013B.
- LOPES, R. B.; FARIA, M.; SOUZA, D. A.; BLOCH JR, C.; SILVA, L. P.; HUMBER, R. A.. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 865-878, 2014.
- LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; ROCHA, L. F.; MONTALVA, C.; LUZ, C.; HUMBER, R. A.; FARIA, M. *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal of invertebrate pathology**, v. 151, p. 165-168, 2018.

LOUREIRO, E. D. S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E.; PESSOA, L. G. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål)(Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 791-798, 2005.

LOUREIRO, E. S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; MENDES, J. M.; PESSOA, L. G. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em condições de campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.1, p.47-53, 2012.

LUANGSA-ARD, J. J.; MONGKOLSAMRIT, S.; THANAKITPIPATTANA, D., KHONSANIT, A.; TASANATHAI, K.; NOISRIPOOM, W.; HUMBER, R. A. Clavicipitaceous entomopathogens: New species in *Metarhizium* and a new genus *Nigelia*. **Mycological progress**, v. 16, n. 4, p. 369-391, 2017.

MACEDO, D.; ALVES, S.B.; VIEIRA, S. A. Screening of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains against *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854)(Hemiptera: Cercopidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 1, p. 47-52, 2006.

MADALENO, L.L.; RAVANELI, G.C.; PRESOTTI, L.E.; MUTTON, M.A.; FERNANDES, O.A.; MUTTON, M.J.R. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. **Neotropical entomology**, v. 37, n. 1, p. 68-73, 2008.

MARQUES, E. J.; LIMA, R. O. R.; OLIVEIRA, J. V. **Pragas da cana-de-açúcar: nordeste do Brasil**. Recife: EDUFRPE, 2009. 54 p.

MARTINS DA SILVA, J. F.; BOTTON, M.; CARBONARI, J. J.; QUINTELA DIAS, E. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, 2004.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. TERRI. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010**. Ieee, 2010. p. 1-8.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; DE BORTOLI, S. A.; DÓRIA, H. O.; BARBOSA, J. C Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 3, p. 382-389, 2006.

NISHI, O.; HASEGAWA, K.; IYAMA, K.; YASUNAGA-AOKI, C.; SHIMIZU, S. Phylogenetic analysis of *Metarhizium* spp. isolated from soil in Japan. **Applied entomology and zoology**, v. 46, n. 3, p. 301-309, 2011

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 124-137, 2007.

POSADA, D.; BUCKLEY, T.R.. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic biology**, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

RAMBAUT, A. Tree figure drawing tool version 1.3. 1. **Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, USA**, 2009.

REHNER, S. A.; KEPLER, R. M. Species limits, phylogeography and reproductive mode in the *Metarhizium anisopliae* complex. **Journal of invertebrate pathology**, v. 148, p. 60-66, 2017.

REZENDE, J. M.; ZANARDO, A. B. R.; DA SILVA LOPES, M.; DELALIBERA JR, I.; REHNER, S. A. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. **BioControl**, v. 60, n. 4, p. 495-505, 2015.

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**, v.76, n.2, p. 303-306, 2009.

ROCHA, L. F.; INGLIS, P. W.; HUMBER, R. A.; KIPNIS, A.; LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 3, p. 251-259, 2013.

ROHDE, C.; ALVES, L. F.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B.; SILVA, E. D.; ALMEIDA, J. D.. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 231-240, 2006.

RONQUIST, F.; KLOPFSTEIN, S.; VILHELMSSEN, L.; SCHULMEISTER, S.; MURRAY, D. L.; RASNITSYN, A. P.). A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the Hymenoptera. **Systematic Biology**, v. 61, n. 6, p. 973-99, 2012.

SABBOUR, M. M. The toxicity effect of nano fungi *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium flavoviride* against the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*

(Zeller). **American Journal of Biology and Life Sciences**, v. 3, n. 5, p. 155-160, 2015.

SAS INSTITUTE. User's manual, version 9.1. 2004.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311-313, 2006.

SHAH, F. A.; WANG, C. S.; BUTT, T. M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 259-266, 2005.

SHOUKOUHI, P.; BISSETT, J. Preferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor 1- $\alpha$  gene (eEF1a1). 2009. **Available at:** <http://www.isth.info/methods/method.php>.

SEPÚLVEDA, M.; VARGAS, M.; GERDING, M.; CEBALLOS, R.; OYARZÚA, P. Molecular, morphological and pathogenic characterization of six strains of *Metarhizium* spp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae). **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 1, p. 77-83, 2016.

SMALL, C. N.; BIDOCHKA, M. J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycological research**, v. 109, n. 3, p. 307-313, 2005.

STEINWENDER, B. M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; THORUP-KRISTENSEN, K.; MEYLING, N. V. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. **Journal of invertebrate pathology**, v. 123, p. 6-12, 2014.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G., NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THOMAS, M.B.. Development of a mycoinsecticide for biological control of locusts in Southern Africa. In: Cheke, R.A., Rosenberg, L.J., Kieser, M.E. (Eds.), **Research Priorities for Migrant Pests of Agriculture in Southern Africa**. Proceedings of a DFID/NRI/ARC-PPRI Workshop, Pretoria, South Africa, 24–26 March 1999. Natural Resources Institute, Chatham, UK, pp. 173–182, 2000.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS D.G.; GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 66, n. 3, p. 407-411, 1976.

VIEIRA, P. D. S.; SILVA, W. M. T.; PAIVA, L. M.; ALVES-LIMA, E. L.; CAVALCANTI, V. L. B. Estudo da caracterização morfológica, esporulação e germinação dos conídios de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em diferentes temperaturas. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 43-47, 2009.

WANG, C.; LEGER, R.J. ST. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 5, p. 937-947, 2005.

## ANEXO I

Nucleotídeos dos isolados de *Metarhizium* sp. estudados e do isolado de referência *M. anisopliae* (ARSEF 7487) utilizado.

### Sequências *Metarhizium* sp. utilizados na pesquisa

#### Fator de alongação da tradução 1 $\alpha$ (TEF)

##### >JD01

AGTCGCCTGCCTTCATTTTCGAACTTTGTAGAAGCTGTTATACTGACTTGCTTGTC  
GTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTACACTTTTCGCCGTCTCGAGTTTGTGATAACT  
GACTGGTCCTCACAGCCACGTGCGACTCCGGCAAGTCTACCACCACTGGTCACTT  
GATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT  
AAGCCAAACCACTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCGATGAACATTATTGG  
GTTTCCCGCTGCCTGTTCGGCCATTACCCCTCACTGTGACACGAAAATTTTCGCG  
GGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCATAACCCCGCCAGCTGTCGAGGGT  
GTCCCTGTGTCTCTCTGGCTGTTGAAACCACAATATTGTCGTTGCTTTTCAGAGGA  
AAAAACAAGAACTAACTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAG  
GGTTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCG  
TGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGT  
CACCGTCATTGGTATGTCGACTTGCGCAAAGTACCGCATACTTTTCTCCCAAAT  
TGAATGCTAATGCCCTCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGACTTTATCAAGA  
ACATGATCACTGGTACT

##### >JD2

AGTCGCCTGCCTTCATTTTCGAACTTTGTAGAAGCTGTTATACTGACTTGCTTGTC  
GTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTACACTTTTCGCCGTCTCGAGTTTGTGATAACT  
GACTGGTCCTCACAGCCACGTGCGACTCCGGCAAGTCTACCACCACTGGTCACTT  
GATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT  
AAGCCAAACCACTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCGATGAACATTATTGG  
GTTTCCCGCTGCCTGTTCGGCCATTACCCCTCACTGTGACACGAAAATTTTCGCG  
GGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCATAACCCCGCCAGCTGTCGAGGGT  
GTCCCTGTGTCTCTCTGGCTGTTGAAACCACAATATTGTCGTTGCTTTTCAGAGGA  
AAAAACAAGAACTAACTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAG  
GGTTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCG

TGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGT  
 CACCGTCATTGGTATGTCGACTTGCGCAAAGTACCGCATACTTTTCTCCCAAAT  
 TGAATGCTAATGCCCTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGACTTTATCAAGA  
 ACATGATCACTGGTACT

**>JD5**

AGTCGCCTGCCTTCATTTTCTGAACTTTGTAGAAGCTGTTATACTGACTTGCTTGTC  
 GTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTACACTTTTCGCCGTCTCGAGTTTGTGATAACT  
 GACTGGTCCTCACAGCCACGTGCGACTCCGGCAAGTCTACCACCACTGGTCACTT  
 GATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT  
 AAGCCAAACCACTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCGATGAACATTATTGG  
 GTTTCCCGCTGCCTGTGCGCCATTACCCCTCACTGTGACACGAAAATTTTCGCG  
 GGGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCATAACCCCGCCAGCTGTCGAGGGT  
 GTCCCTGTGTCTCTCTGGCTGTTGAAACCACAATATTGTCGTTGCTTTCAGAGGA  
 AAAACAAGAACTAACTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAG  
 GGTTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCG  
 TGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGT  
 CACCGTCATTGGTATGTCGACTTGCGCAAAGTACCGCATACTTTTCTCCCAAAT  
 TGAATGCTAATGCCCTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGACTTTATCAAGA  
 ACATGATCACTGGTACT

**>JD13**

AGTCGCCTGCCTTCATTTTCTGAACTTTGTAGAAGCTGTTATACTGACTTGCTTGTC  
 GTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTACACTTTTCGCCGTCTCGAGTTTGTGATAACT  
 GACTGGTCCTCACAGCCACGTGCGACTCCGGCAAGTCTACCACCACTGGTCACTT  
 GATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT  
 AAGCCAAACCACTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCGATGAACATTATTGG  
 GTTTCCCGCTGCCTGTGCGCCATTACCCCTCACTGTGACACGAAAATTTTCGCG  
 GGGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCATAACCCCGCCAGCTGTCGAGGGT  
 GTCCCTGTGTCTCTCTGGCTGTTGAAACCACAATATTGTCGTTGCTTTCAGAGGA  
 AAAACAAGAACTAACTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAG  
 GGTTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCG  
 TGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGT  
 CACCGTCATTGGTATGTCGACTTGCGCAAAGTACCGCATACTTTTCTCCCAAAT

TGAATGCTAATGCCCTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGACTTTATCAAGA  
ACATGATCACTGGTACT

**>JD21**

AGTCGCCTGCCTTCATTTCGAACTTTGTAGAAGCTGTTATACTGACTTGCTTGTC  
GTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTACACTTTTCGCCGTCTCGAGTTTGTGATAACT  
GACTGGTCCTCACAGCCACGTGCGACTCCGGCAAGTCTACCACCACTGGTCACTT  
GATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTTCGAGAAGGT  
AAGCCAAACCACTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCGATGAACATTATTGG  
GTTTCCCGCTGCCTGTTCGGCCATTACCCCTCACTGTGACACGAAAATTTTCGCG  
GGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCATAACCCCGCCAGCTGTTCGAGGGT  
GTCCCTGTGTCTCTCTGGCTGTTGAAACCACAATATTGTCGTTGCTTTCAGAGGA  
AAAAACAAGAACTAACTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAG  
GGTTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCG  
TGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTTCGAGACTCCCAAGTACTATGT  
CACCGTCATTGGTATGTCGACTTGCGCAAACCTGACCGCATACTTTTCTCCCAAAT  
TGAATGCTAATGCCCTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGACTTTATCAAGA  
ACATGATCACTGGTACT

**>JD22**

AGTCGCCTGCCTTCATTTCGAACTTTGTAGAAGCTGTTATACTGACTTGCTTGTC  
GTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTACACTTTTCGCCGTCTCGAGTTTGTGATAACT  
GACTGGTCCTCACAGCCACGTGCGACTCCGGCAAGTCTACCACCACTGGTCACTT  
GATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTTCGAGAAGGT  
AAGCCAAACCACTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCGATGAACATTATTGG  
GTTTCCCGCTGCCTGTTCGGCCATTACCCCTCACTGTGACACGAAAATTTTCGCG  
GGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCATAACCCCGCCAGCTGTTCGAGGGT  
GTCCCTGTGTCTCTCTGGCTGTTGAAACCACAATATTGTCGTTGCTTTCAGAGGA  
AAAAACAAGAACTAACTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAG  
GGTTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCG  
TGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTTCGAGACTCCCAAGTACTATGT  
CACCGTCATTGGTATGTCGACTTGCGCAAACCTGACCGCATACTTTTCTCCCAAAT  
TGAATGCTAATGCCCTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGACTTTATCAAGA  
ACATGATCACTGGTACT

**RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit)****>JD01**

CTTTCGCTTCGACGCTCTCTCACTTGCGACGAACCAACACGCCGATTGGTAGAG  
 ATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACACACACTGGGGCTTGGTC  
 TGCCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCCTGGTCAAGAACCTGTC  
 ATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACCGGCCGAGCCATTGATTGAATTCAT  
 GATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTGGAAAGAGTACGAGCCGCTGAGATATCCCC  
 ATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTGGTGGTGTACACCAAGATCCTAA  
 GCACCTGGTCAGCCAAGTCTTGGATACTAGACGAAAGTCGTATCTGCAGTACGA  
 GGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGTTCAAGATTTTCTCCGACGC  
 TGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTTTACTGTACAGCAAGAAGATGATCCCGAGAC  
 TGGCATTGAAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAAAGAGTTGGTTAACAAGCTTGCT  
 AAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAAGCGAGAAAATTGGCTGGGAAGG  
 ACTGATTCGTGCCGGCGCCGTCGAGTACCTCGATGCCGAAGAAGAAGAGACAT  
 CAATGATCTGCATGACGCCAGAAGATCTTGAGCTGTATCGTCTGCAGAAAGCCG  
 GTGTTGCTCTGGATGACGATATTGGAGATGACCTGAATAAGCGTCTCAAGACCA  
 AGACCAACCCACAACGCACATGTATACGCATTGTGAAATTCACCCAGTATGA  
 TTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTCCGTTCCCCGATCACAACCAGGTAAGCAG  
 C

**>JD02**

CTTTCGCTTCGACGCTCTCTCACTTGCGACGAACCAACACGCCGATTGGTAGAG  
 ATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACACACACTGGGGCTTGGTC  
 TGCCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCCTGGTCAAGAACCTGTC  
 ATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACCGGCCGAGCCATTGATTGAATTCAT  
 GATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTGGAAAGAGTACGAGCCGCTGAGATATCCCC  
 ATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTGGTGGTGTACACCAAGATCCTAA  
 GCACCTGGTCAGCCAAGTCTTGGATACTAGACGAAAGTCGTATCTGCAGTACGA  
 GGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGTTCAAGATTTTCTCCGACGC  
 TGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTTTACTGTACAGCAAGAAGATGATCCCGAGAC  
 TGGCATTGAAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAAAGAGTTGGTTAACAAGCTTGCT  
 CAAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAAGCGAGAAAATTGGCTGGGAAG  
 GACTGATTCGTGCCGGCGCCGTCGAGTACCTCGATGCCGAAGAAGAAGAGACA

TCAATGATCTGCATGACGCCAGAAGATCTTGAGCTGTATCGTCTGCAGAAAGCC  
GGTGTGCTCTGGATGACGATATTGGAGATGACCTGAATAAGCGTCTCAAGACC  
AAGACCAACCCCAACGCACATGTATACGCATTGTGAAATTCACCCCAGTATG  
ATTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTCCGTTCCCCGATCACAACCAGGTAAGCA  
GC

**>JD05**

CTTTCGCTTCGACGCTCTCTCACTTGCGACGAACCAACACGCCGATTGGTAGAG  
ATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACACACACTGGGGCTTGGTC  
TGTCCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCCTGGTCAAGAACCTGTC  
ATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACCGGCCGAGCCATTGATTGAATTCAT  
GATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTGGAAAGAGTACGAGCCGCTGAGATATCCCC  
ATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTGGGTTGGTGTACACCAAGATCCTAA  
GCACCTGGTCAGCCAAGTCTTGGATACTAGACGAAAGTCGTATCTGCAGTACGA  
GGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGTTCAAGATTTTCTCCGACGC  
TGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTACTGTACAGCAAGAAGATGATCCCGAGAC  
TGGCATTGAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAAAGAGTTGGTTAACAAGCTTGC  
CAAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAAGCGAGAAAATTGGCTGGGAAG  
GACTGATTTCGTGCCGGCGCCGTCGAGTACCTCGATGCCGAAGAAGAAGAGACA  
TCAATGATCTGCATGACGCCAGAAGATCTTGAGCTGTATCGTCTGCAGAAAGCC  
GGTGTGCTCTGGATGACGATATTGGAGATGACCTGAATAAGCGTCTCAAGACC  
AAGACCAACCCCAACGCACATGTATACGCATTGTGAAATTCACCCCAGTATG  
ATTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTCCGTTCCCCGATCACAACCAGGTAAGCA  
GC

**>JD13**

CTTTCGCTTCGACGCTCTCTCACTTGCGACGAACCAACACGCCGATTGGTAGAG  
ATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACACACACTGGGGCTTGGTC  
TGTCCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCCTGGTCAAGAACCTGTC  
ATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACCGGCCGAGCCATTGATTGAATTCAT  
GATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTGGAAAGAGTACGAGCCGCTGAGATATCCCC  
ATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTGGGTTGGTGTACACCAAGATCCTAA  
GCACCTGGTCAGCCAAGTCTTGGATACTAGACGAAAGTCGTATCTGCAGTACGA  
GGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGTTCAAGATTTTCTCCGACGC

TGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTTTACTGTACAGCAAGAAGATGATCCCGAGAC  
 TGGCATTGAAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAAAGAGTTGGTTAACAAGCTTGCT  
 AAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAAGCGAGAAAATTGGCTGGGAAGG  
 ACTGATTCGTGCCGGCGCCGTTCGAGTACCTCGATGCCGAAGAAGAAGAGACAT  
 CAATGATCTGCATGACGCCAGAAGATCTTGAGCTGTATCGTCTGCAGAAAGCCG  
 GTGTTGCTCTGGATGACGATATTGGAGATGACCTGAATAAGCGTCTCAAGACCA  
 AGACCAACCCCAACGCACATGTATACGCATTGTGAAATTCACCCCAGTATGA  
 TTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTCCGTTCCCCGATCACAACCAGGTAAGCAG  
 C

**>JD21**

CTTTCGCTTCGACGCTCTCTCACTTGCGACGAACCAACACGCCGATTGGTAGAG  
 ATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACACACACTGGGGCTTGGTC  
 TGTCCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCCTGGTCAAGAACCTGTC  
 ATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACCGGCCGAGCCATTGATTGAATTCAT  
 GATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTGGAAAGAGTACGAGCCGCTGAGATATCCCC  
 ATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTGGGTTGGTGTACACCAAGATCCTAA  
 GCACCTGGTCAGCCAAGTCTTGGATACTAGACGAAAGTCGTATCTGCAGTACGA  
 GGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGTTCAAGATTTTCTCCGACGC  
 TGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTTTACTGTACAGCAAGAAGATGATCCCGAGAC  
 TGGCATTGAAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAAAGAGTTGGTTAACAAGCTTGCT  
 AAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAAGCGAGAAAATTGGCTGGGAAGG  
 ACTGATTCGTGCCGGCGCCGTTCGAGTACCTCGATGCCGAAGAAGAAGAGACAT  
 CAATGATCTGCATGACGCCAGAAGATCTTGAGCTGTATCGTCTGCAGAAAGCCG  
 GTGTTGCTCTGGATGACGATATTGGAGATGACCTGAATAAGCGTCTCAAGACCA  
 AGACCAACCCCAACGCACATGTATACGCATTGTGAAATTCACCCCAGTATGA  
 TTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTCCGTTCCCCGATCACAACCAGGTAAGCAG  
 C

**>JD22**

CTTTCGCTTCGACGCTCTCTCACTTGCGACGAACCAACACGCCGATTGGTAGAG  
 ATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACACACACTGGGGCTTGGTC  
 TGTCCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCCTGGTCAAGAACCTGTC  
 ATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACCGGCCGAGCCATTGATTGAATTCAT

GATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTGGGAAGAGTACGAGCCGCTGAGATATCCCC  
 ATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTGGTGGTGTACACCAAGATCCTAA  
 GCACCTGGTCAGCCAAGTCTTGGATACTAGACGAAAGTCGTATCTGCAGTACGA  
 GGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGTTCAAGATTTTCTCCGACGC  
 TGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTACTGTACAGCAAGAAGATGATCCCGAGAC  
 TGGCATTGAAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAAAGAGTTGGTTAACAAGCTTGCT  
 AAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAAGCGAGAAAATTGGCTGGGAAGG  
 ACTGATTCGTGCCGGCGCCGTCGAGTACCTCGATGCCGAAGAAGAAGAGACAT  
 CAATGATCTGCATGACGCCAGAAGATCTTGAGCTGTATCGTCTGCAGAAAGCCG  
 GTGTTGCTCTGGATGACGATATTGGAGATGACCTGAATAAGCGTCTCAAGACCA  
 AGACCAACCCCAACGCACATGTATACGCATTGTGAAATTCACCCAGTATGA  
 TTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTCCGTTCCCCGATCACAACCAGGTAAGCAG  
 C

**RPB1 (RNA polymerase II largest subunit)**

**>JD1**

GCTGATTTTGACGGTGACGAAATGAACTTGCACGTCCCGCAGACTGAAGAAACA  
 CGTGCAGAAGTCAAGGAGTTGTGCCTTGTGCCCAACAATATTGTCTCTCCTCAG  
 AAGAACGGTCCCTTGATGGGTATTGTGCAGGACTCCCTTGCTGGTGTTTACAAA  
 CTCTGCAGACGAGACACCTTTATCGACAAGGAAATGGTCATGAACATGATGCTC  
 TGGGTGCCTAATTGGGACGGTGTATTCCCCAACCCAGCCATTCTCAAACCGCGG  
 CCTCGCTGGACCGGAAAACAGCTCATCAGCATGGTCATTCTCAGGAGATTAGT  
 TTGCATGCCCTGAAGGTGACTCTGATATCCCCCTCAAGGATACCGGGCTCCTT  
 ATCCAGAGCGGCGAACTTCTGTATGGTCTTCTGAAGAAGAAAAATGTGGGTGCA  
 GCGGCTGGTGGTATTATTCATCTGTGCTACAATGAGCTTGGCCCCGATGGTGCC  
 ATGGCTTTTCTGAATGGTGTTCACAAGTAGTCACTTATTGGCTTCTCAATACCG  
 GTCACAGTATCGGTATTGGAGATACTGTTCCAGACAAGCAGACCATTGAAAAGA  
 TTCAGGTTACATTGACACACAGAAGGCCGAAGTCGCCAAGCTCACGGCC

**>JD2**

GCTGATTTTGACGGTGACGAAATGAACTTGCACGTCCCGCAGACTGAAGAAACA  
 CGTGCAGAAGTCAAGGAGTTGTGCCTTGTGCCCAACAATATTGTCTCTCCTCAG  
 AAGAACGGTCCCTTGATGGGTATTGTGCAGGACTCCCTTGCTGGTGTTTACAAA  
 CTCTGCAGACGAGACACCTTTATCGACAAGGAAATGGTCATGAACATGATGCTC  
 TGGGTGCCTAATTGGGACGGTGTATTCCCCAACCCAGCCATTCTCAAACCGCGG

CCTCGCTGGACCGGAAAACAGCTCATCAGCATGGTCATTCCCTCAGGAGATTAGT  
 TTGCATGCCCCTGAAGGTGACTCTGATATCCCCCTCAAGGATACCGGGCTCCTT  
 ATCCAGAGCGGCGAACTTCTGTATGGTCTTCTGAAGAAGAAAAATGTGGGTGCA  
 GCGGCTGGTGGTATTATTCATCTGTGCTACAATGAGCTTGGCCCCGATGGTGCC  
 ATGGCTTTTCTGAATGGTGTTCACAAGTAGTCACTTATTGGCTTCTCAATACCG  
 GTCACAGTATCGGTATTGGAGATACTGTTCCAGACAAGCAGACCATTGAAAAGA  
 TTCAGGTTACATTGACACACAGAAGGCCGAAGTCGCCAAGCTCACGGCC

**>JD5**

GCTGATTTTGACGGTGACGAAATGAACTTGCACGTCCCGCAGACTGAAGAAACA  
 CGTGCAGAAGTCAAGGAGTTGTGCCTTGTGCCAACAATATTGTCTCTCCTCAG  
 AAGAACGGTCCCTTGATGGGTATTGTGCAGGACTCCCTTGCTGGTGTTTACAAA  
 CTCTGCAGACGAGACACCTTTATCGACAAGGAAATGGTCATGAACATGATGCTC  
 TGGGTGCCTAATTGGGACGGTGTATTCCCCAACCAGCCATTCTCAAACCGCGG  
 CCTCGCTGGACCGGAAAACAGCTCATCAGCATGGTCATTCCCTCAGGAGATTAGT  
 TTGCATGCCCCTGAAGGTGACTCTGATATCCCCCTCAAGGATACCGGGCTCCTT  
 ATCCAGAGCGGCGAACTTCTGTATGGTCTTCTGAAGAAGAAAAATGTGGGTGCA  
 GCGGCTGGTGGTATTATTCATCTGTGCTACAATGAGCTTGGCCCCGATGGTGCC  
 ATGGCTTTTCTGAATGGTGTTCACAAGTAGTCACTTATTGGCTTCTCAATACCG  
 GTCACAGTATCGGTATTGGAGATACTGTTCCAGACAAGCAGACCATTGAAAAGA  
 TTCAGGTTACATTGACACACAGAAGGCCGAAGTCGCCAAGCTCACGGCC

**>JD13**

GCTGATTTTGACGGTGACGAAATGAACTTGCACGTCCCGCAGACTGAAGAAACA  
 CGTGCAGAAGTCAAGGAGTTGTGCCTTGTGCCAACAATATTGTCTCTCCTCAG  
 AAGAACGGTCCCTTGATGGGTATTGTGCAGGACTCCCTTGCTGGTGTTTACAAA  
 CTCTGCAGACGAGACACCTTTATCGACAAGGAAATGGTCATGAACATGATGCTC  
 TGGGTGCCTAATTGGGACGGTGTATTCCCCAACCAGCCATTCTCAAACCGCGG  
 CCTCGCTGGACCGGAAAACAGCTCATCAGCATGGTCATTCCCTCAGGAGATTAGT  
 TTGCATGCCCCTGAAGGTGACTCTGATATCCCCCTCAAGGATACCGGGCTCCTT  
 ATCCAGAGCGGCGAACTTCTGTATGGTCTTCTGAAGAAGAAAAATGTGGGTGCA  
 GCGGCTGGTGGTATTATTCATCTGTGCTACAATGAGCTTGGCCCCGATGGTGCC  
 ATGGCTTTTCTGAATGGTGTTCACAAGTAGTCACTTATTGGCTTCTCAATACCG

GTCACAGTATCGGTATTGGAGATACTGTTCCAGACAAGCAGACCATTGAAAAGA  
 TTCAGGTTACATTGACACACAGAAGGCCGAAGTCGCCAAGCTCACGGCC

**>JD21**

GCTGATTTTGACGGTGACGAAATGAACTTGCACGTCCCGCAGACTGAAGAAACA  
 CGTGCAGAAGTCAAGGAGTTGTGCCTTGTGCCCAACAATATTGTCTCTCCTCAG  
 AAGAACGGTCCCTTGATGGGTATTGTGCAGGACTCCCTTGCTGGTGTTTACAAA  
 CTCTGCAGACGAGACACCTTTATCGACAAGGAAATGGTCATGAACATGATGCTC  
 TGGGTGCCTAATTGGGACGGTGTTATTCCCCAACCCAGCCATTCTCAAACCGCGG  
 CCTCGCTGGACCGGAAAACAGCTCATCAGCATGGTCATTCCCTCAGGAGATTAGT  
 TTGCATGCCCCTGAAGGTGACTCTGATATCCCCCTCAAGGATACCGGGCTCCTT  
 ATCCAGAGCGGCGAACTTCTGTATGGTCTTCTGAAGAAGAAAAATGTGGGTGCA  
 GCGGCTGGTGGTATTATTCATCTGTGCTACAATGAGCTTGGCCCCGATGGTGCC  
 ATGGCTTTTCTGAATGGTGTTCACAAGTAGTCACTTATTGGCTTCTCAATACCG  
 GTCACAGTATCGGTATTGGAGATACTGTTCCAGACAAGCAGACCATTGAAAAGA  
 TTCAGGTTACATTGACACACAGAAGGCCGAAGTCGCCAAGCTCACGGCC

**>JD22**

GCTGATTTTGACGGTGACGAAATGAACTTGCACGTCCCGCAGACTGAAGAAACA  
 CGTGCAGAAGTCAAGGAGTTGTGCCTTGTGCCCAACAATATTGTCTCTCCTCAG  
 AAGAACGGTCCCTTGATGGGTATTGTGCAGGACTCCCTTGCTGGTGTTTACAAA  
 CTCTGCAGACGAGACACCTTTATCGACAAGGAAATGGTCATGAACATGATGCTC  
 TGGGTGCCTAATTGGGACGGTGTTATTCCCCAACCCAGCCATTCTCAAACCGCGG  
 CCTCGCTGGACCGGAAAACAGCTCATCAGCATGGTCATTCCCTCAGGAGATTAGT  
 TTGCATGCCCCTGAAGGTGACTCTGATATCCCCCTCAAGGATACCGGGCTCCTT  
 ATCCAGAGCGGCGAACTTCTGTATGGTCTTCTGAAGAAGAAAAATGTGGGTGCA  
 GCGGCTGGTGGTATTATTCATCTGTGCTACAATGAGCTTGGCCCCGATGGTGCC  
 ATGGCTTTTCTGAATGGTGTTCACAAGTAGTCACTTATTGGCTTCTCAATACCG  
 GTCACAGTATCGGTATTGGAGATACTGTTCCAGACAAGCAGACCATTGAAAAGA  
 TTCAGGTTACATTGACACACAGAAGGCCGAAGTCGCCAAGCTCACGGCC

**$\beta$ -tubulina**

**>JD01**

TCGCTGCTATTTTCGAATGATCGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTCGA  
 CAGGGTAACCAAATTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGGC  
 CTCGACAGCAATGGTGTCTACAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTATG  
 AGCGTCTACTTCAATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAGG  
 AACCATAGGTTGTTATCCATGTGAGAGATCAACGACTGACGCGGGGACTCCCCT  
 CAAAAGGCCTCCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCTTGTCGATCTTGAA  
 CCTGGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCCGGTCAGCTTTTCCGTCC  
 CGACAACCTTCGTCTTTGGCCAGTCTGG

**>JD2**

TCGCTGCTATTTTCGAATGATCGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTCGA  
 CAGGGTAACCAAATTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGGC  
 CTCGACAGCAATGGTGTCTACAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTATG  
 AGCGTCTACTTCAATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAGG  
 AACCATAGGTTGTTATCCATGTGAGAGATCAACGACTGACGCGGGGACTCCCCT  
 CAAAAGGCCTCCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCTTGTCGATCTTGAA  
 CCTGGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCCGGTCAGCTTTTCCGTCC  
 CGACAACCTTCGTCTTTGGCCAGTCTGG

**>JD5**

TCGCCGCTATTTTCGAATGATCGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTCGA  
 CAGGGTAACCAAATTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGGC  
 CTCGACAGCAATGGTGTCTACAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTATG  
 AGCGTCTACTTCAATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAGG  
 AACCATAGGTTGTTATCCATGTGAGAGATCAACGACTGACGCGGGGACTCCCCT  
 CAAAAGGCCTCCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCTTGTCGATCTTGAA  
 CCTGGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCCGGTCAGCTTTTCCGTCC  
 CGACAACCTTCGTCTTTGGCCAGTCTGG

**>JD13**

TCGCCGCTATTTTCGAATGATCGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTCGA  
 CAGGGTAACCAAATTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGGC  
 CTCGACAGCAATGGTGTCTACAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTATG  
 AGCGTCTACTTCAATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAGG

AACCATAGGTTGTTATCCATGTGAGAGATCAACGACTGACGCGGGGACTCCCCT  
 CAAAAGGCCTCCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCTTGTGATCTTGAA  
 CCTGGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCCGGTCAGCTTTTCCGTCC  
 CGACAACCTTCGTCTTTGGCCAGTCTGG

**>JD21**

TCGCCGCTATTTTCGAATGATCGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTGA  
 CAGGGTAACCAAATTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGGC  
 CTCGACAGCAATGGTGTCTACAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTATG  
 AGCGTCTACTTCAATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAGG  
 AACCATAGGTTGTTATCCATGTGAGAGATCAACGACTGACGCGGGGACTCCCCT  
 CAAAAGGCCTCCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCTTGTGATCTTGAA  
 CCTGGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCCGGTCAGCTTTTCCGTCC  
 CGACAACCTTCGTCTTTGGCCAGTCTGG

**>JD22**

TCGCCGCTATTTTCGAATGATCGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTGA  
 CAGGGTAACCAAATTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGGC  
 CTCGACAGCAATGGTGTCTACAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTATG  
 AGCGTCTACTTCAATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAGG  
 AACCATAGGTTGTTATCCATGTGAGAGATCAACGACTGACGCGGGGACTCCCCT  
 CAAAAGGCCTCCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCTTGTGATCTTGAA  
 CCTGGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCCGGTCAGCTTTTCCGTCC  
 CGACAACCTTCGTCTTTGGCCAGTCTGG

**Isolado de Referência**

**>DQ463996.2 *M. anisopliae* ARSEF 7487 TEF**

AGTCGCCTGCCTTCATTTTGAACCTTTGTAGAAGCTGTTATACTGACTTGCTTGTC  
 GTAGGGGTATGTTTCCGGAGCCTACACTTTTCCGGTCTCGAGTTTGTGATAACT  
 GACTGGTCCTCACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCACTGGTCACTT  
 GATCTACCAGTGCCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTTCGAGAAGGT  
 AAGCCAGACCACTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCGATGAACATTATTGG  
 GTTTCCCGCTGCCTGTCCGGCATTACCCCTCACTGTGACACGAAAATTTTCCGG  
 GGGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCATACCCCGCCAGCTGTGAGGGT

GTCTGTGTGTCTCTGGCTGTTGAAACCACAATATTGTCGTTGCTTTCAGAGGAAA  
 AAACAAGAACTAACTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAGGG  
 TTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTG  
 GTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCA  
 CCGTCATTGGTATGTGCGACTTGCGCAAAGTACCAGCATACTTTTCTCCCAAATTG  
 AATGCTAATGCCCTCCACAGACGCTCCCGGTACCGTGACTTTATCAAGAAC  
 ATGATCACTGGTACT

**>DQ468370.1 *Metarhizium anisopliae* ARSEF 7487 RPB2**

CTTTTGCTTCGACGCTCTCTCACTTGCGACGAACCAACACACCGATTGGTAGAG  
 ATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACACACACTGGGGCTTGGTC  
 TGTCCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCCTGGTCAAGAACCTGTC  
 ATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACCGGCCGAGCCATTGATTGAATTCAT  
 GATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTGGAAAGAGTACGAGCCGCTGAGATATCCCC  
 ATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTGGTGGTGTACACCAAGATCCTAA  
 GCACCTGGTCAGCCAAGTCTTGATACTAGACGAAAGTCGTATCTGCAGTACGA  
 GGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGTTCAAGATTTTCTCCGACGC  
 TGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTTTACTGTACAGCAAGAAGATGATCCCGAGAC  
 TGGCATTGAAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAAAGAGTTGGTTAACAAGCTTGCT  
 AAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAAGCGAGAAAATTGGCTGGGAAGG  
 ACTGATTCGTGCCGGCGCCGTCGAGTACCTCGATGCTGAAGAAGAAGAGACAT  
 CAATGATCTGCATGACGCCAGAGGATCTTGAGCTGTATCGTCTGCAGAAAGCCG  
 GTGTTGCTCTTGATGACGATATTGGAGATGACCTGAATAAGCGTCTCAAGACCA  
 AGACCAACCCACAACGCACATGTATACGCATTGTGAAATTCACCCAGTATGA  
 TTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTCCCTTCCCCGATCACAATCAGGTAAGCAG  
 C

**>KJ398685.1 *Metarhizium anisopliae* ARSEF 7487 RPB1**

GCTGATTTTGACGGAGACGAAATGAACTTGCACGTCCCGCAGACTGAAGAAACA  
 CGTGACAGAAGTCAAGGAGTTGTGCCTTGTGCCAACAATATTGTCTCTCCTCAG  
 AAGAACGGTCCCTTGATGGGTATTGTGCAGGACTCCCTTGCTGGTGTTTACAAA  
 CTCTGCAGACGAGACACCTTTATCGACAAGGAAATGGTCATGAACATGATGCTC  
 TGGGTGCCTAATTGGGACGGTGTATTCCCAACCAGCCATTCTCAAACCGCGG  
 CCTCGCTGGACCGGAAAACAGCTCATCAGCATGGTCATTCCCTCAGGAGATTAGT

TTGCATGCCCCTGAAGGTGACTCTGATATCCCCCTCAAGGATACCGGGCTCCTT  
ATCCAGAGCGGCGAACTTCTGTATGGTCTTCTGAAGAAGAAAAATGTGGGTGCA  
GCGGCTGGTGGTATTATTCATCTGTGCTACAATGAGCTTGGCCCCGATGGTGCC  
ATGGCTTTTCTGAATGGTGTTCACAAGTAGTCACTTATTGGCTTCTCAATACCG  
GTCACAGTATCGGTATTGGAGATACTGTTCCAGACAAGCAGACCATTGAAAAGA  
TTCAGGTTACATTGACACACAGAAGGCCGAAGTCGCCAAGCTCACGGCC

**>EU248822.1 *Metarhizium anisopliae* ARSEF 7487 TUB**

TCGCCGCTATTTTTCGAATGAATCGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTCG  
ACAGGGTAACCAAATTGGTGCCGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGG  
CCTCGACAGCAATGGTGTCTATAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTAT  
GAGCGTCTACTTCAATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAG  
GAACCATAGGTTGTTATCCATGGGAGAGATCAATGACTGACGCGGGGACTCCC  
CTCAAAGGCCTCCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCCTTGTGATCTTG  
AACCTGGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTTGGTCAGCTTTTCCGTC  
CCGACAACCTTCGTCTTTGGCCAGTCTGG