



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIEL VINÍCIUS FERRI

**“VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Beauveria bassiana*
E DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR
ISOLADOESPECÍFICO”**

Londrina
2010

DANIEL VINÍCIUS FERRI

**“VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Beauveria bassiana*
E DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR
ISOLADOESPECÍFICO”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Londrina
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F388v Ferri, Daniel Vinicius.

Variabilidade genética de *Beauveria bassiana* e desenvolvimento de Marcador
Isolado-Específico / Daniel Vinicius Ferri. – Londrina, 2010.
76 f. : il.

Orientador: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual
de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular, 2010.

Inclui bibliografia.

1. *Beauveria bassiana* – Teses. 2. Fungos – Genética – Teses. 3. Fungos – Controle
biológico – Teses. 4. Fungos entomopatogênicos – Teses. 5. Polimorfismo – Teses. 6.
Monitoramento biológico – Teses. 7. Broca-da-bananeira – Teses. 8. Banana – Doenças e
Pragas – Teses. I. Fungaro, Maria Helena Pelegrinelli. II. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.2:582.28

DANIEL VINÍCIUS FERRI

**“VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Beauveria bassiana*
E DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR ISOLADO ESPECÍFICO”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Helena P. Fungaro
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia
UEL – Londrina – PR

Londrina, 26 de março de 2010.

DEDICATÓRIA

*À minha família e amigos e à Dra.
Maria Helena P. Fungaro.*

AGRADECIMENTOS

À minha família por toda confiança;

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Helena P. Fungaro, pela orientação, dedicação e exemplo;

À recente-doutora do Laboratório Dra. Daniele Sartori pela colaboração em várias etapas deste trabalho;

À Ms. Carla de Freitas Munhoz pelo auxílio nos experimentos e análises dos dados de AFLP;

À Profa. Dra. Fernanda Simões Almeida e Prof. Dr. Pedro Neves pelas críticas e sugestões na ocasião do exame de qualificação;

Aos amigos de Laboratório, Juliana Soares Gonçalves, Lucas Eduardo Costa, Carla Beatriz Fier, Lígia Uno Lunardi, Lara Munique Ferracin, pelo companheirismo;

A todos os colegas do Mestrado em Genética e Biologia Molecular;

À Técnica Administrativa Maria Sueli Trindade Miranda pela disposição em nos atender sempre que necessário;

A todos os professores do Mestrado em Genética e Biologia Molecular pelos ensinamentos no decorrer das disciplinas;

À Universidade Estadual de Londrina – UEL pela oportunidade;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

FERRI, Daniel Vinícius. **Análise da Variabilidade Genética de *Beauveria bassiana* e Desenvolvimento de Marcador Isolado-Específico**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

Um dos problemas da cultura da banana é a presença de pragas que limitam a produção e afetam a qualidade dos frutos. Dentre as pragas dessa cultura destaca-se o *Cosmopolites sordidus* (coleóptera Dryophthoridae). A utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* como agente de controle biológico de *C. sordidus* pode contribuir para a redução do uso de inseticidas químicos. Para o desenvolvimento de produtos a base de *B. bassiana* é importante o conhecimento da variabilidade genética da espécie e a seleção de isolados mais efetivos para o controle da praga de interesse. Da mesma forma, o desenvolvimento de marcadores isolados-específicos é de importância para o monitoramento de persistência e comportamento de um isolado em campo. O objetivo desta dissertação foi avaliar a variabilidade genética de *B. bassiana* e desenvolver um marcador isolado-específico para detecção e monitoramento em campo. Para tanto, foi realizada a análise de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) e análise de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) de 42 isolados de *Beauveria bassiana*, obtidos de diversas regiões geográficas do Brasil e de diferentes hospedeiros da família Dryophthoridae. A partir dos *fingerprints* de DNA gerados pelas técnicas RAPD e AFLP obteve-se, respectivamente 92% e 88% de locos polimórficos. Os isolados de *B. bassiana* foram atribuídos a 2 *clusters* genotípicos quando considerados os dados de RAPD, e 3 *clusters* genotípicos quando analisados por AFLP. O sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do *cluster* de DNA ribossomal permitiu identificar que os isolados pertencem ao clado A de *B. bassiana*. A análise da variância molecular (AMOVA), também realizada separadamente para os dados gerados por RAPD e AFLP, mostrou que a variabilidade entre os isolados não está correlacionada com a origem geográfica ou com os hospedeiros. Um marcador de RAPD específico para o isolado CG 1024 foi clonado e sequenciado. A partir das sequências obtidas foram desenhados *primers* PCR específicos 1024F₈₃₈ (5'TGC GGC TGA GGA GGA CT 3') e 1024R₈₃₈ (5' TGC GGC TGA GTG TAG AAC 3'), para detecção e monitoramento do referido isolado em campo.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*. RAPD. AFLP. Identificação molecular.

FERRI, Daniel Vinícius. **Analysis of Genetic Variability in *Beauveria bassiana* and Development of an Isolate-Specific Marker**. 2010. 80 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Londrina State University.

ABSTRACT

One of the problems experienced in banana cultivation is the presence of pests that limit production and harm fruit quality. Banana pests include the weevil *Cosmopolites sordidus* (Dryophthoridae). The use of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent for *C. sordidus* can contribute to reducing the use of chemical pesticides in banana crops. In order to develop *B. bassiana*-based products, it is important to know the genetic variability of the species and to select the most effective isolates to control the pest. Likewise, the development of isolate-specific markers is important for monitoring the persistence and behavior of an isolate in the field. The aim of this dissertation is to assess the genetic variability of *B. bassiana* and develop an isolate-specific marker for field inspection and monitoring. Accordingly, RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) and AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analyses were carried out on 42 *B. bassiana* isolates, obtained from various regions of Brazil and different hosts of the Dryophthoridae family. Based on the DNA *fingerprints* generated using the RAPD and AFLP techniques, polymorphic loci of 92% and 88%, respectively, were obtained. The *B. bassiana* isolates were divided into two genotype *clusters* when the RAPD data were considered, and into three genotype *clusters* when analyzed using AFLP. By sequencing the ITS1-5,8S-ITS2 region of the ribosomal DNA *cluster*, it was found that all the isolates belong to clade A of *B. bassiana*. An analysis of molecular variance (AMOVA), also conducted separately for the data generated by RAPD and AFLP, showed that the variability between the isolates is not correlated with geographical origin or hosts. A specific RAPD marker for isolate CG 1024 was cloned and sequenced. Based on the sequences obtained, specific PCR *primers* 1024F₈₃₈ (5'TGC GGC TGA GGA GGA CT 3') and 1024R₈₃₈ (5' TGC GGC TGA GTG TAG AAC 3') were designed to detect and monitor the respective isolate in the field.

Keywords: *Beauveria bassiana*. RAPD. AFLP. Molecular identification.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Isolados de *Beauveria bassiana* utilizados no estudo.....17

Artigo

Table 1 Isolates of the *Beauveria bassiana* analysed in this study62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Gel de agarose mostrando o *fingerprint* gerado por *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) utilizando-se o *primer OPE 14*; Canaleta M, marcador de peso molecular 1 kb plus – DNA Ladder38
- Figura 2** – Gel de poliacrilamida mostrando o *fingerprint* gerado por (AFLP) utilizando-se a combinação de *primers E+CG/M+AG*; Canaleta M, mistura dos marcadores de peso molecular 100 pb e 25 pb (Invitrogen®)39
- Figura 3** – Dendrogramas gerados a partir dos dados de similaridade genética entre isolados de *B. bassiana*, agrupados de acordo com o método UPGMA, usando locos obtidos por RAPD (A) e AFLP (B). As regiões de cada isolado estão representadas pelas cores correspondentes ao mapa. Os valores de *bootstrap* maiores que 50%, obtidos de 1000 reamostragens, estão indicados nos nós40
- Figura 4** – Gráficos resultantes dos testes de atribuição, realizados pelo o *software Structure 2.2*, a partir dos dados gerados por RAPD (A) e AFLP (B). Cada barra vertical representa um isolado e cada cor representa um *cluster*. A coordenada Y mostra o coeficiente de participação (Q) de um isolado no *cluster*43
- Figura 5** – Arvore filogenética gerada a partir das seqüências da região ITS1 – 5,8S – ITS2 de isolados de *B. bassiana* através do programa CLUSTAL-W pelo método neighbour-joining. As seqüências obtidas no presente trabalho são dos isolados marcados com asterisco. As demais seqüências foram obtidas do banco de dados do NCBI e estão identificadas conforme o número de acesso45
- Figura 6** – Detecção do isolado CG 1024 baseada em PCR específica utilizando os primers 1024F₈₃₈ e 1024R₈₃₈ correspondente ao fragmento de 838pb indicado. Coluna M, marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder. Fragmento de 580 pb correspondente a

amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2, utilizadas como controle positivo para todos os isolados46

Artigo

- Figure 1** – Agarose gel showing the fingerprint generated by *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) using *OPE 14 primer*; Lane M, molecular weight marker 1 kb plus – DNA Ladder63
- Figure 2** – Polyacrylamide gel showing the fingerprint generated by *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) using a combination of *primers E+CG/M+AG*; Lane M, mixture of 100 bp and 25 bp molecular weight markers (Invitrogen®)63
- Figure 3** – Dendrograms generated from data on genetic similarity among isolates of *B. bassiana*, grouped according the UPGMA method, using loci obtained by RAPD (A) and AFLP (B). The regions of each isolate are represented by colors corresponding to the map. Bootstrap values higher than 50%, obtained from 1000 resamplings, are indicated at the nodes.....64
- Figure 4** – Graphic resulting from attribution tests carried out using *software Structure 2.2*, based on data generated by RAPD (A) and AFLP (B). Each vertical bar represents an isolate and each color represents a *cluster*. The Y-coordinate shows the participation coefficient (Q) of an isolate in the cluster65
- Figure 5** – Alignment generated by the CLUSTALW program and shaded using BOXSHADE. Identical nucleotides are marked by black boxes and distinct nucleotides are not shaded65
- Figure 6** – Phylogenetic tree generated from sequences in the ITS1 – 5,8S – ITS2 region of isolates of *B. bassiana* using the CLUSTAL-W program and the neighborjoining method. The sequences obtained in this study are from the isolates marked with an asterisk. The other sequences were obtained from the NCBI database and are identified by accession number66

Figure 7 – Detection based on a specific PCR using the 1024F₈₃₈ and 1024R₈₃₈ primers of *B. bassiana* isolate CG 1024, corresponding to the 838-bp fragment indicated. Lane M, 1 kb Plus DNA Ladder molecular weight marker. 580-bp fragment corresponding to amplification of the ITS1-5,8S-ITS2 region, used as a positive control for all isolates67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1.1	Fungos Entomopatogênicos Relacionados ao Controle Biológico da Broca-dorizoma	14
1.1.2	Taxonomia do Gênero <i>Beauveria</i>	17
1.1.3	Variabilidade Genética de <i>Beauveria bassiana</i>	20
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
3.2	OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	28
3.3	POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO (RAPD)	29
3.4	POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)	29
3.5	ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS.....	30
3.6	AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2	31
3.7	SELEÇÃO DE BANDA ESPECÍFICA E ELUIÇÃO DO MARCADOR EM GEL DE AGAROSE.....	32
3.8	CLONAGEM DO MARCADOR.....	33
3.9	EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIOS	34
3.10	SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO CLONADO	35
3.11	LAVAGEM DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO.....	35
3.12	ESTUDO DAS SEQUENCIAS OBTIDAS	36
3.13	DESENHO DE <i>PRIMERS</i>	36
3.14	PCR ESPECÍFICA.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTUDO DA ESTRUTURA DA POPULAÇÃO DE <i>B. BASSIANA</i>	38
4.2	DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR ISOLADO-ESPECÍFICO	45
5	ARTIGO	47

CONSIDERAÇÕES FINAIS68

REFERÊNCIAS69

1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* sp) é a fruta mais produzida e consumida no mundo. Seu cultivo tem impacto econômico e social para vários países, onde é cultivada por pequenos, médios e grandes produtores rurais. No cenário mundial, o Brasil destaca-se na produção de banana sendo o segundo maior produtor dessa fruta, superado apenas pela Índia. Dentre as diversas variedades de frutas produzidas em nosso país, a produção de banana, em volume, é superada apenas pela laranja. Apesar disso, o Brasil não se destaca na exportação de banana.

Um dos problemas no cultivo da banana é a presença de pragas que limitam a produção e afetam a qualidade dos frutos. O intenso uso de inseticidas no combate de pragas é um dos fatores que dificulta a exportação do produto brasileiro. Dentre as pragas dessa cultura considera-se como uma das mais severas o *Cosmopolites sordidus*, um inseto (coleóptera) pertencente à família Dryophthoridae que é conhecido popularmente como “moleque-da-bananeira” ou “broca-do-rizoma”.

A principal forma de controle da broca-do-rizoma é o controle químico, porém os inseticidas usualmente empregados possuem toxicidade elevada e sofrem restrições por deixarem resíduos tóxicos no produto. Este é um dos motivos que prejudica a aceitação do produto pelo mercado internacional, sendo necessário melhorar a qualidade do produto, reduzindo a utilização de inseticidas, seja com vistas ao mercado interno ou externo. Frente a este problema, a utilização de agentes de controle biológico, tais como os fungos entomopatogênicos, é uma alternativa interessante.

Na tentativa de reduzir resíduos químicos, vários estudos com entomopatógenos para o controle de *C. sordidus* foram realizados e o maior potencial tem sido detectado para o uso do fungo filamentosso *Beauveria bassiana*. Este entomopatógeno tem se mostrado eficiente em campo no controle da praga, no entanto essa eficiência depende das isolados e metodologias utilizadas. É consenso na literatura, que um dos fatores de importância para a obtenção de sucesso no uso de *B. bassiana* no controle de *C. sordidus* é a seleção de isolados com alta virulência e adaptação às condições climáticas da região onde será feita a aplicação.

Neste sentido, a caracterização da variabilidade genética de *B. bassiana* através de marcadores moleculares multilocos é uma ferramenta extremamente útil para direcionar a escolha de isolados a serem avaliados, por meio de bioensaio, quanto ao caráter virulência a *C. sordidus* e adaptação a condições ambientais. Além disso, a caracterização molecular também proporciona o desenvolvimento de metodologias que permitam a identificação de uma dada linhagem de interesse, o que é útil para avaliação do comportamento e monitoramento da linhagem no ambiente.

Este trabalho teve por objetivo analisar a variabilidade genética, por meio de marcadores de RAPD e AFLP, de uma coleção de isolados de *B. bassiana* que vem sendo estudada quanto ao potencial para controle biológico de *C. sordidus*. Configura-se também como objetivo a obtenção de um marcador isolado-específico útil para o monitoramento do isolado no ambiente.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Fungos Entomopatogênicos Relacionados ao Controle Biológico da Brocado-rizoma

Um dos problemas no cultivo da banana é a presença de pragas que limitam a produção e afetam a qualidade dos frutos. Entre estas pragas destaca-se a brocado-rizoma, que é também popularmente conhecida como moleque-da-bananeira (ARLEU; NETO, 1984). A broca-do-rizoma é o nome popular dado ao *Cosmopolites sordidus*, um inseto (coleóptera) pertencente à família Dryophthoridae. Os danos provocados pelo inseto são, essencialmente, atribuídos à forma larval, que causa a formação de galerias no rizoma da bananeira. As galerias formadas debilitam as plantas tornando-as mais sensíveis ao tombamento. Além disso, as galerias no rizoma também causam danos indiretos, uma vez que favorece a penetração de patógenos nas áreas atacadas, podendo causar a morte da planta (MESQUITA, 2003).

A principal forma de controle desta praga é o controle químico, com a utilização de produtos inseticidas. Tais produtos possuem toxicidade elevada e podem representar riscos à saúde e ao meio ambiente. Além disso, o princípio ativo desses inseticidas pode deixar resíduos no fruto (LARA et al., 2000). Por tais motivos, os frutos tratados com inseticidas vêm sofrendo sérias restrições no exterior prejudicando a exportação da banana.

Visando melhorar a qualidade da banana buscando qualidade internacional, é necessário adotar medidas que reduzam o uso de inseticidas, minimizando riscos à saúde e ao meio ambiente. Para tanto, a utilização de fungos filamentosos como agentes de controle biológico é uma alternativa interessante, pois estes não deixam resíduos tóxicos nos frutos e no ambiente, podem atuar por longo período de tempo, além de serem compatíveis com outras estratégias de controle (BORGES, 2003). Segundo Murad et al. (2007), o uso de fungos entomopatogênicos tem sido extensivamente investigado e tornou-se uma alternativa viável para controle de pragas causadas por determinadas espécies de coleópteras.

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos relatados no Brasil, sendo constatados mais de 20 gêneros importantes (ALVES, 1998). Dentre eles destacam-se espécies dos gêneros: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Isaria*, *Enthomorphthora* e *Hirsutella*.

Os fungos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foram avaliados quanto à eficiência para controle biológico da broca do rizoma e, em condições de campo, os resultados indicaram ser *B. bassiana* mais eficiente no combate à esta praga (BATISTA FILHO et al., 1991). Essas observações conduziram ao estudo da virulência de diferentes isolados de *B. bassiana* para utilização em controle biológico de *Comopolites sordidus*.

O gênero *Beauveria* mostra-se bastante promissor para utilização em controle biológico, já que é capaz de atacar uma grande variedade de insetos em diferentes estágios do seu ciclo biológico (REIS et al. 2001), além de possuir uma grande variabilidade genética, o que permite estudos de seleção de isolados mais virulentos para o controle de pragas (ALMEIDA; MACHADO, 2006). Vários isolados de *Beauveria* foram avaliados para uso potencial em programas de controle biológico, sendo frequentemente obtidos de cadáveres de insetos infectados (DEVI et al. 2001) ou do solo (CHASE et al. 1986) e, posteriormente, utilizados para controle biológico (CRUZ et al. 2005; DOLCI et al. 2006). Esses fungos são

cultivados em laboratório e podem ser estocados em solução de glicerol a baixas temperaturas (HUMBER, 2009). As facilidades no cultivo e no estoque favorecem a produção em escala industrial (FENG et al. 1988), assim, produtos comerciais baseados em *Beauveria* vêm sendo desenvolvidos e diversos isolados avaliadas quanto à virulência (INGLIS et al. 2001).

Mundialmente são encontrados diversos produtos comerciais para controle biológico contendo *B. bassiana* como ingrediente ativo (BUTT; WALDEN, 2000). Micopesticidas baseados em *B. bassiana* (33,9%), *M. anisopliae* (33,9%), *Lecanicillium* spp. (9,4%), *Isaria fumosorosea* Wize (5,8%) e *B. brongniartii* (4,1%) são os mais comuns dentre os produtos já desenvolvidos em escala mundial (FARIA; WRAIGHT, 2007).

Atualmente, 32 produtos baseados em fungos entomopatogenicos encontramse disponíveis no mercado brasileiro. Micopesticidas à base de *M. anisopliae* representam 65% dos produtos nacionais, seguido por *Beauveria bassiana* (20%), *Lecanicillium* spp. (7,5%) e *Sporothrix insectorum* (7,5%), tendo como alvos cigarrinhas, percevejo-de-renda, cochonilhas, besouros e ácaros fitófagos (MICHEREFF et al., 2009).

Buscando reduzir os resíduos de inseticidas presentes no cultivo da banana foram realizados estudos com entomopatógenos para o controle de *C. sordidus*. Isolados de *B. bassiana* foram avaliados quanto à virulência à broca-do-rizoma e observou-se que este fungo é capaz de proporcionar redução significativa na população da praga (BATISTA FILHO et al. 1995a; BATISTA FILHO et al. 1996; JORDÃO et al. 1999; AKELLO et al. 2008).

Apesar dos relatos na literatura acerca dos bons resultados apresentados em experimentos de laboratório com *B. bassiana* no controle de pragas, algumas circunstâncias ambientais adversas, incluindo a temperatura, a luz solar, umidade e precipitação, podem trazer dificuldades para utilização no controle de pragas a campo (THOMPSON et al. 2006). Para tentar contornar estas limitações, métodos de utilização de *B. bassiana* têm sido testados.

Em um trabalho realizado por Akello et al. (2007) foram avaliadas diferentes estratégias para aplicação de *B. bassiana* na cultura da banana analisando os possíveis efeitos prejudiciais da aplicação de *B. bassiana* para a planta. No referido estudo foram utilizados três isolados de *B. bassiana* que foram aplicadas utilizando as seguintes estratégias: 1. Mergulhando as raízes e o rizoma

em uma suspensão conidial; 2. Injetando uma suspensão conidial no rizoma da planta e 3. Crescendo as plantas no solo estéril misturado com carcaça do arroz e colonizado por *B. bassiana*. Quatro semanas após as inoculações, foram avaliados os parâmetros de crescimento da planta, tais como, peso e altura da planta e comprimento e largura das folhas. Foi também avaliada a taxa de colonização do tecido da planta, por meio do re-isolamento dos isolados. Foi observado, através dessas análises, que os isolados de *B. bassiana* podiam colonizar as raízes, os rizomas e as bases do pseudocaulo da bananeira e que mergulhando as plantas em uma suspensão conidial foi possível obter a colonização mais elevada sem o efeito negativo no crescimento ou na sobrevivência de planta, demonstrando que, dependendo do método de inoculação do isolado, *B. bassiana* pode estabelecer um relacionamento endofítico com o tecido das plantas na cultura da banana sem causar nenhum efeito prejudicial.

Posteriormente, Akello et al 2008 avaliou a virulência de *B. bassiana* a brocado- rizoma após obter a colonização da planta mergulhando as plantas em uma suspensão conidial. Foi verificado, então, que, após 15 semanas, a presença de *B. bassiana* como um endófito em tecidos da banana reduziu significativamente as populações da broca da banana e seu dano às plantas.

Desse modo, com a padronização dos métodos de aplicação de *B. bassiana* em campo, a sua utilização para controle biológico de *Cosmopolites sordidus* pode representar uma alternativa com potencial para reduzir o uso de inseticidas químicos no cultivo da banana, buscando diminuir os impactos ambientais, melhorar a qualidade do produto para o consumo interno, atingir qualidade internacional e favorecer o aumento das exportações.

1.1.2 Taxonomia do Gênero *Beauveria*

O entomologista italiano, Agostino Bassi (1835) foi quem primeiro descreveu o gênero *Beauveria*, identificando o fungo como o agente etiológico do *mal del segno* ou doença da “marca”, igualmente conhecido como o *calcinaccio* ou o *cannellino* na Itália e *muscardino* branco na França. Esse microrganismo infectava e matava larvas do bicho-da-seda. Em seus estudos com *Beauveria*, Bassi foi o

primeiro a demonstrar que os microrganismos podem atuar como patógenos de pragas.

O primeiro reconhecimento taxonômico do fungo do muscardino foi proposto por Giusepp Balsamo-Crivelli que homenageou as descobertas de Bassi nomeando o patógeno de *Bolrylis bassiana*. Posteriormente, esse fungo recebeu outras denominações, tais como *Beauveria densa*, *Beauveria globulifera*, *Sporotrichum densum* e *Sporotrichum globuliferum*. Entretanto, o gênero *Beauveria* foi formalmente descrito somente no início do século XX por Vuillemin (1912), que designou *Bolrylis bassiana* como uma espécie tipo (AINSWORTH, 1973).

Diversos estudos foram conduzidos para avaliar as características morfológicas da espécie. Conforme a revisão de Rehner e Buckley (2005), Petch (1926), através de caracteres morfológicos, reconheceu duas espécies, *B. bassiana* e *B. densa* e concluiu que os caracteres observados em cultura não eram informativos para a delimitação da espécie. MacLeod (1954) também reconheceu somente duas espécies, que classificou em *B. bassiana* e *B. brongniartii*. Hoog (1972) concordou com MacLeod, mas reconheceu uma espécie adicional, *B. alba*, que foi transferida mais tarde a *Engyodontium* (HOOG, 1978). Posteriormente, os investigadores passaram a seguir MacLeod (1954) e Hoog (1972) classificando os isolados em *B. bassiana* ou *B. brongniartii*, uma prática refletida em textos contemporâneos e chaves de identificação da espécie.

De acordo com Mugnai et al. (1989), seis espécies de *Beauveria* foram identificadas através de caracteres morfológicos. São elas: *B. alba*, *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* e *B. vermiconia*.

Atualmente, o gênero *Beauveria* pertence à classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Cordycipitaceae (HUMBER, 2007), não apresenta ciclo sexual conhecido, reproduzindo-se por ciclos assexuais, através dos conídios que se originam por divisões mitóticas em estruturas diferenciadas (DALZOTO, 2004).

A forma do conídio é uma das principais características morfológicas utilizadas para a identificação de espécies do gênero *Beauveria*. Desse modo, as espécies de *Beauveria* são classificadas morfolologicamente, entre outras características, através do formato de seus conídios (GLARE; INWOOD, 1998).

Segundo a forma, os conídios dos fungos do gênero *Beauveria* podem ser globosos, elipsoidais, cilíndricos, ou em forma de vírgula, e seu tamanho varia entre 1,7 a 5,5 µm de comprimento (REHNER; BUCKLEY, 2005). No entanto, a

classificação através de características morfológicas é difícil, uma vez que proporcionam informações limitadas para o reconhecimento de espécies de *Beauveria*.

REHNER e BUCKLEY (2005) contrastaram a eficácia da utilização dos métodos morfológicos e métodos moleculares na investigação da diversidade de *Beauveria* e de espécies de *Cordyceps* possivelmente relacionadas. Os autores identificaram as isolados utilizadas através de caracteres morfológicos observando o formato dos conídios e através da análise filogenética de sequências das regiões ITS e do gene EF1 alfa. Os resultados obtidos através dos métodos moleculares permitiram a visualização de seis clados (A ao F) dentro do gênero *Beauveria*. Esses autores relacionaram, então, a morfologia dos conídios com os clados obtidos através dos métodos moleculares. O clado B foi composto por isolados de *B. brongniartii*, provenientes da Ásia e da Europa e caracterizado por conídio elipsoidal. O clado D incluiu as espécies *B. caledonica* e *B. vermiconia*, que produzem conídios cilíndricos e em forma de vírgula, respectivamente. O clado E foi formado por espécies de *Beauveria* anamorfos e um *Cordyceps* teleomorfo, ambos apresentando conídios elipsoidais. O Clado F inclui a espécie sul americana *B. amorpha*, que produz conídios cilíndricos. O clado A foi composto por isolados de *Beauveria bassiana* globalmente distribuídos e incluiu, também, o teleomorfo *Cordyceps staphylinidaecola*. Já, no clado C, todos os isolados presentes eram *Beauveria bassiana* originários da Europa e da América do Norte. Quanto à morfologia conidial, os clados A e C apresentaram o mesmo formato, ou seja, o clado C, através de técnicas moleculares, se apresentou filogeneticamente distinto do clado A, no entanto, através de caracteres morfológicos os clados A e C são classificados como *B. bassiana*, uma vez que apresentaram o mesmo formato de conídio (globoso e subgloboso).

A morfologia convergente dos conídios produzidos por membros do clado A e C demonstra certa confusão taxonômica quanto aos caracteres morfológicos e não evidenciam a real diversidade da espécie dentro destes grupos.

Desse modo, as características morfológicas não são suficientes para distinguir os clados A e C como espécies diferentes. Os demais clados corresponderam à espécie previamente descrita com base na morfologia conidial. Assim, o autor sugere a seleção de um neótipo do clado A ou C para a descrição de uma segunda espécie, de modo que o clado A seja designado como *B. bassiana*,

uma vez que diversas isolados estudadas para controle biológico e inúmeras isolados comercialmente registradas para uso no biocontrole foram dispostas filogeneticamente no clado A, indicando que o clado A, provavelmente, representa o que a maioria dos pesquisadores considera ser *B. bassiana*.

1.1.3 Variabilidade Genética de *Beauveria Bassiana*

Instituições brasileiras de pesquisa vêm desenvolvendo trabalhos utilizando o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* para o controle de diversas pragas da agricultura, sendo este fungo um dos agentes de controle biológico de *Cosmopolites sordidus* mais estudados e utilizados no Brasil. Isto se deve ao fato dele ser capaz de causar menos danos em relação à utilização dos inseticidas convencionais, além de ser facilmente produzido a um custo relativamente baixo (FANCELLI et al. 2004).

Para que produtos desenvolvidos com uso do fungo *B. bassiana* sejam liberados no ambiente é importante o conhecimento da diversidade genética, das relações desses isolados com fatores ambientais ou locais e compreensão das estruturas das populações desses fungos. Além disso, a identificação exata dos isolados é a condição prévia para o registro e a patente de algum produto biopesticida, e fundamental para o monitoramento da persistência e comportamento de um isolado após sua liberação no ambiente (PIPE et al. 1995).

A dificuldade em se identificar um isolado fúngico específico após sua aplicação no ambiente tem prejudicado o desenvolvimento desses agentes entomopatogênicos para controle biológico e a maioria dos micopesticidas brasileiros não possuem registro (MICHEREFF et al. 2009). Portanto, para que haja a identificação e correto monitoramento desses fungos são necessários métodos que diferenciem o organismo introduzido do restante da população (CASTRILLO et al. 2003).

Embora morfológicamente distinguível como um gênero, a identificação de espécies do gênero *Beauveria* é difícil por causa de sua simplicidade estrutural e da falta da variação fenotípica distintiva. Da mesma forma, características fenotípicas são insuficientes para distinguir os diferentes isolados de

Beauveria, sendo inviável seu uso para monitoramento de agentes de controle biológico (CASTRILLO et al. 2003).

A falta de caracteres morfológicos taxonomicamente informativos além de não permitir o monitoramento de agentes de controle biológico também dificultou, por muito tempo, a avaliação da diversidade da espécie. Com o advento de diferentes técnicas que permitem detectar variações moleculares, esta dificuldade tem sido contornada através do uso de marcadores de RFLP (MAURER et al. 1997, NEUVEGLISE et al. 1997; COATES et al. 2002; MURO et al. 2003), RAPD (BIDOCHKA et al. 1994; CRAVANZOLA et al. 1997; MAURER et al. 1997; GLARE; INWOOD, 1998; CARNEIRO et al. 2008), AFLP (MURO et al. 2003; CRUZ et al. 2005; DEVI et al. 2006; FERNANDES et al. 2009) e análise das seqüências de nucleotídeos das regiões ITS (NEUVEGLISE et al. 1994; COATES et al. 2002; MURO et al. 2003; CRUZ et al. 2005; REHNER; BUCKLEY, 2005).

Tais estudos demonstraram que os marcadores moleculares são capazes de detectar variação inter e intra-específica em espécies de *Beauveria* com maior número de informações do que métodos morfológicos, possibilitando, desse modo, uma melhor distinção entre as espécies de *Beauveria* e, principalmente, entre isolados de uma mesma espécie de *Beauveria*.

As informações proporcionadas por essa variedade de técnicas moleculares permitiram avanços no estudo taxonômico de *Beauveria* e nos anos posteriores foram publicados numerosos trabalhos utilizando técnicas moleculares em estudos de *Beauveria*. Muitos desses trabalhos demonstraram associação entre caracteres genotípicos e hospedeiros (POPRAWSKI et al. 1988; NEUVÉGLISE et al. 1997; VIAUD et al. 1996; CRAVANZOLA et al. 1997; BERRETA et al. 1998; PIATTI et al. 1998; CARNEIRO et al. 2008). Em contraste, outros trabalhos utilizando as mesmas técnicas, mas diferentes conjuntos de isolados não encontraram correlação estatisticamente significativa entre genótipos e hospedeiros (MAURER et al. 1997; URTZ; RICE, 1997; COATES et al. 2002; MURO et al. 2005). Há ainda na literatura trabalhos que relatam a associação entre a variação molecular de isolados de *B. bassiana* e a origem geográfica destes (GLARE; INWOOD 1998; BIDOCHKA et al. 2002; WANG et al. 2003; FERNANDES et al. 2009) e outros estudos onde nenhuma correlação entre isolados e as origens geográficas foram observadas (BERRETTA et al. 1998; GAITAN et al. 2002; MURO et al. 2003; CRUZ et al. 2005).

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem associação entre dados moleculares e hospedeiros, Bidochka et al. (2002) sugerem que a estrutura da população relacionando inseto-hospedeiro para *B. bassiana* deve ser vista primeiramente como a co-ocorrência coincidente do microrganismo patogênico com um inseto suscetível em um determinado habitat. O fungo *Metarhizium anisopliae*, por exemplo, possui determinadas características genéticas que são adaptadas para a infecção do inseto (ST. LEGER; BIDOCHKA, 1996), mas em um estudo genético da população de *Metarhizium anisopliae* foi demonstrado que o genótipo desses fungos está associado com o habitat (BIDOCHKA et al. 2001). Resultado semelhante para o fungo *B. bassiana* foi encontrado num trabalho realizado por Bidochka et al. (2002), onde 61 isolados de *B. bassiana* foram avaliados quanto à tolerâncias à exposição UV e quanto à habilidade de crescimento em 8, 15, 25 e 37°C. Nesse trabalho, grupos genéticos de *B. bassiana* isolados do solo canadense foram divididos entre diferentes tipos de habitat, definidos como campos agrícolas e campos florestais. Constatou-se, então, que os isolados dos solos agrícolas tiveram maior crescimento em temperaturas mais elevadas e eram mais resistentes à radiação de luz ultravioleta do que isolados dos solos florestais. Desse modo, os autores supõem que fatores abióticos no ambiente podem selecionar os genótipos que podem sobreviver às condições específicas em cada habitat do fungo. De acordo com Wang et al. (2005), o elevado nível de variabilidade genética entre os isolados derivados da natureza pode ser atribuído a seus diversos habitats devido às várias mudanças que ocorrem num habitat em relação a outro.

Em um trabalho mais recente, Meyling et al. (2009), buscou determinar a distribuição ambiental e estrutura genética de *Beauveria* dentro de um único agroecossistema. Para investigar o efeito do ambiente na composição da comunidade, esse ecossistema foi dividido em área de superfície e área subterrânea e entre solo arável cultivado e solo silvestre não cultivado. Foram então coletados 77 isolados de *Beauveria*, sendo 28 isolados coletados dos solos, 34 de insetos infectados e 15 isolados coletados de três espécies de plantas comuns na flora local. Esses isolados foram identificados até espécie através do sequenciamento da região alfa 1 e de um marcador intergênico nuclear, denominado "Bloc". Os autores verificaram que dentro do ecossistema estudado todas as espécies de *Beauveria* identificadas foram encontradas tanto abaixo do solo quanto na superfície – nas plantas e nos insetos infectados. Esta ocorrência simultânea sugere, segundo os

autores, que os fungos identificados circulam livremente entre o ambiente subterrâneo do solo e a superfície nos insetos infectados e nas plantas ocupando nichos de sobreposição. Esse estudo demonstrou também não haver associação entre *B. bassiana* com os hospedeiros particulares.

Embora os estudos mencionados anteriormente apresentem diferentes conclusões, todos demonstraram que marcadores moleculares são eficazes em detectar variação inter e intra-específica em espécies de *Beauveria*.

Além da utilização de marcadores moleculares multilocus, os genes ribossomais nucleares do DNAr dos fungos mostraram-se úteis para taxonomia de fungos entomopatogênicos. Uma unidade de DNAr apresenta-se constituída de regiões que possuem genes que são altamente conservados, úteis na comparação de organismos distantemente relacionados, como é o caso da região 18S e porções um pouco mais variáveis, como a porção 28S, sendo apropriada para comparar diferentes gêneros. As porções 18S e 28S possuem regiões altamente conservadas o que permitiu a construção de *primers* ditos universais que se anelam nas regiões conservadas das porções 18 S e 28 S e amplificam os espaços transcritos internos ITS1, ITS2 e a região gênica 5,8S situada entre eles. Uma vez que as regiões ITS evoluem rapidamente estas regiões apresentam seqüências de nucleotídeo variáveis permitindo a caracterização de espécies fúngicas, podendo ser apropriada para discriminar espécies relacionadas ou, até mesmo, isolados de uma mesma espécie (FUNGARO, 2000).

Muro et al. (2003), usando ITS-RFLP (*internal-transcribed-spacer ribosomal region restriction fragment length polymorphism*), sequenciamento da região ITS e AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), analisaram a variabilidade genética de 50 isolados de *Beauveria* spp coletados de insetos e do solo de 17 países, incluindo o Brasil. Nesse trabalho foi demonstrado que a técnica de AFLP proporciona mais informações quando comparada à técnica de ITS-RFLP, já que os isolados de *B. bassiana* não puderam ser distinguidos por esta técnica, uma vez que todos apresentaram um mesmo padrão de banda. Esse trabalho demonstrou ainda que a técnica de AFLP é adequada para identificação inter-específica dos isolados e para estudar a variabilidade molecular intra específica dos mesmos. Segundo este autor a técnica de AFLP pode ser um marcador molecular confiável para estudar a variabilidade genética de *B. bassiana*, pois engloba análise total do genoma com uma grande quantidade de informações. Esse trabalho

demonstrou também que dois isolados de *B. bassiana* coletados de diferentes insetos e provenientes de duas regiões distantes do Brasil (Mato Grosso e Amazonas) apresentaram similaridade de 82% sugerindo que as regiões geográficas distintas dentro de um país não são responsáveis pela dissimilaridade entre os isolados avaliados no estudo.

Posteriormente, Muro et al. (2005) investigaram a diversidade genética e caracterizaram 110 isolados de *Beauveria*, sendo 104 isolados pertencentes à espécie *B. bassiana*. Para tanto, além de ITS-RFLP, sequenciamento da região ITS e AFLP foi utilizada a técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Nesse trabalho, as técnicas: ITS-RFLP e sequenciamento da região ITS novamente não detectaram variação genética significativa entre os isolados, impossibilitando o estabelecimento de associações entre os isolados com sua origem geográfica ou seus respectivos hospedeiros. Ao contrário, as análises de ISSR e AFLP deram indicações sobre agrupamentos intra-específicos correlacionando perfil genético e origem geográfica, no entanto não houve associação entre os isolados com seus respectivos hospedeiros de origem.

Buscando encontrar uma região mais informativa que a região ITS para caracterização de isolados fungicos, Kouvelis et al. (2008), utilizando *primers* para a região ITS1-5,8S-ITS2 e duas regiões intergênicas mitocondriais, denominadas, *nad3-atp9* e *atp6-rns*. Os autores relataram que as seqüências de nucleotídeos das regiões intergênicas NAD3-ATP9 e ATP6-RNS são mais informativas que a região ITS1-5,8S-ITS2, uma vez que através delas foi possível agrupar os isolados de *B. bassiana* de acordo com suas origens geográficas. Além disso, a amplificação das regiões intergênicas *nad3-atp9* e *atp6-rns* gerou diferentes tamanhos de amplicons para os diferentes isolados *B. bassiana* o que possibilita a distinção de grupos através de eletroforese de alta resolução o que não seria possível através da região ITS1-5,8S-ITS2.

Embora as regiões ITS não tenham sido eficientes para detectar variação genética entre os isolados de *Beauveria bassiana* e determinar associações com hospedeiros particulares ou origens geográficas, tais regiões são eficientes para identificação de espécies dentro do gênero *Beauveria*, sendo utilizados com o propósito de identificação para *Beauveria brongniartii* (NEUVEGLISE et al. 1997) e *B. bassiana* (MURO et al. 2003; REHNER; BUCKLEY, 2005).

Recentemente, Carneiro et al. (2008) avaliaram a virulência de 24 isolados de *Beauveria* contra larvas de *Spodoptera frugiperda*. Nesse trabalho, os isolados utilizados foram avaliados através do sequenciamento da região ITS do rDNA e de marcadores RAPD. O sequenciamento de fragmentos de 570 pares de bases da região ITS do rDNA permitiu a identificação dos isolados pela comparação com seqüências depositadas no GenBank. Através das análises dos dados de RAPD foi possível agrupar os isolados de acordo com o inseto hospedeiro e com a virulência contra a lagarta-do-cartucho do milho. Desse modo ficou demonstrado que o sequenciamento da região ITS aliado aos marcadores RAPD é útil na seleção e identificação de isolados potencialmente eficazes contra larvas de *S. frugiperda*.

Conclui-se neste tópico da revisão que os marcadores de DNA têm auxiliado no esclarecimento da posição taxonômica de isolados pertencentes ao gênero *Beauveria* e na análise de variabilidade intra-específica. Apesar do número relevante de estudos, a existência de associação entre perfil molecular dos isolados de *B. bassiana* e inseto hospedeiro de origem não é consenso na literatura. Da mesma forma, é a literatura para a existência de associação entre perfil molecular dos isolados e suas origens geográficas. Os trabalhos apresentados nesta revisão demonstram que os marcadores de RAPD e/ou AFLP revelam significativa variação entre isolados da espécie *B. bassiana*. No entanto, nenhum deles desenvolveu marcador isolado-específico visando o rápido e eficaz monitoramento após aplicação no campo.

2 OBJETIVOS

Esta dissertação teve por objetivo: a) analisar a variabilidade genética de 42 isolados de *Beauveria bassiana*; b) Analisar possíveis associações entre agrupamentos moleculares e origem dos isolados; c) alocar os isolados em clados já descritos para *B. bassiana*; d) desenvolver um marcador específico para o isolado CG 1024, relatado como promissor para o controle da broca-do-rizoma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foi utilizada, neste estudo, uma coleção de 42 isolados do fungo *Beauveria bassiana* obtidos de diversas regiões geográficas do Brasil e de diferentes hospedeiros da família Dryophthoridae. Estes isolados pertencem à Coleção de fungos entomopatogênicos da Universidade Estadual de Londrina e à EMBRAPA/CENARGEN (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados de *Beauveria bassiana* utilizados no estudo.

Código	Local de origem	Hospedeiro
CG 11	Londrina – PR	<i>Sternechus subsignatus</i>
CG 138	Recife – PE	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 458	Londrina – PR	<i>Anthonomus grandis</i>
CG 475	Londrina – PR	<i>Sternechus subsignatus</i>
CG 478	Campinas – SP	<i>Anthonomus grandis</i>
CG 545	Aracajú – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 547	Estância – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 556	Santa Luzia – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 557	Ilha das Flores – SE	<i>Homalinotus coriaceus</i>
CG 864	Saquarema – RJ	<i>Homalinotus coriaceus</i>
CG 865	Malhador – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 876	Município de Wagner – BA	<i>Metamasius hemipterus</i>
CG 877	Juazeiro do Norte – CE	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 881	Faxinal – RS	<i>Ochetina</i> sp.
CG 890	Itajaí – SC	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 919	S. José do Rio Preto – SP	<i>Hypothenemus hampei</i>
CG 928	Aracaju – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 929	Aracaju – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 930	Aracaju – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 1008	Piracicaba – SP	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1012	Brasília – DF	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1013	Brasília – DF	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1014	Brasília – DF	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 02	Desconhecida	Desconhecida

CG 1021	Goiânia – GO	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1024	Cruz das Almas – BA	<i>Metamasius hemipterus</i>
CG 1028	Cruz das Almas – BA	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1029	Vicência – PE	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1035	Desconhecida	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 17	Cosmópolis – SP	<i>Anthonomus grandis</i>
IBCB 39	BA	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 47	Cascavel – PR	<i>Anthonomus grandis</i>
IBCB 82	Goiania – GO	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 84	Cascavel – PR	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 97	Cascavel – PR	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 98	Lavras – MG	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 135	Desconhecida	Desconhecida
UEL 08	Assai – PR	<i>Hypothenemus hampei</i>
UNI 39	S.M. Iguazú – PR	<i>Cosmopolites sordidus</i>
UNI 40	Cascavel – PR	<i>Cosmopolites sordidus</i>
UEL 177	Desconhecida	Desconhecido
UEL 50	Desconhecida	Desconhecido

IBCB, Instituto Biológico; CG Cenargem/Embrapa; UEL, Universidade Estadual de Londrina; UNI, Universidade do Oeste do Paraná.

3.2 OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a extração do DNA genômico, primeiramente foi obtido micélio de cada isolado através de suspensão de aproximadamente 10^7 conídios em 2,5 mL de Tween 80 em tubos de ensaio. Um mililitro desta solução foi inoculado em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio completo líquido descrito por Pontecorvo et al. (1953). Após a inoculação, as culturas foram mantidas a 28°C por 48 horas. Em seguida, o micélio foi coletado por filtração e lavado em água destilada esterilizada para proceder à extração do DNA genômico conforme a descrição de Azevedo et al. (2000). A quantificação do DNA das amostras foi feita por comparação de intensidade das bandas com o DNA do fago λ (lambda) em gel de agarose 0,8 % e fotodocumentado em um sistema de imagem digital LPIX Loccus[®].

3.3 POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO (RAPD)

No desenvolvimento da técnica RAPD foram utilizados os *primers* OPX 7, OPX 13, OPE 11, OPE 14 e OPE 15 (Invitrogen®). As reações de amplificação foram preparadas com volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500nM KCL 10x concentrado) (Invitrogen®), 0,25 mM de dNTP, 0,25 µM de *primer*, 3mM de MgCl₂, 0,4 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 10 ng da amostra de DNA. Para preparo das reações controles, foram adicionados todos os reagentes, porém foi omitido o DNA genômico. A mistura da reação foi submetida ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) previamente programado para 40 ciclos após desnaturação inicial a 92°C por 4 min., 40 ciclos (92°C por 40 seg., 40°C por 1,5 min. e 72°C por 2 min.) e 1 ciclo final a 72°C durante 5 min. Após a amplificação, os fragmentos foram separados por de eletroforese em gel de agarose 1.4 % (p/v), e fotodocumentado em um sistema de imagem digital LPIX Loccus®

3.4 POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

Baseado no protocolo utilizado por Lopes et al. (2006), modificado de Vos et al. (1995), na etapa de hidrólise enzimática foi realizada uma dupla digestão, ou seja, uma reação com as duas enzimas de restrição ao mesmo tempo. Na reação, foram utilizados 12,5 ng de DNA, 2 µL de tampão 10x *One Phor All* Amersham®, 0,2 µL de BSA 100x (N.E. Biolabs®), 6 U da enzima *MseI* (N.E. Biolabs®) (corte freqüente), 6 U da enzima *EcoRI* (Promega®) (corte raro) e 6,7 µL de água ultrapura esterilizada para completar o volume final de 20 µL. Os tubos com os reagentes foram mantidos por 4 h a 37°C, para que a reação ocorresse e, em seguida, por 20 min. a 65°C, para bloquear a ação das enzimas.

Para ligação dos adaptadores foram acrescentados ao material digerido um mix contendo: 2,0 µL de tampão 10x para enzima ligase (N.E. Biolabs®),

de 1,0 μL de adaptador *EcoRI* a 5 μM , 1 μL de adaptador *MseI* a 50 μM , 0,17 μL da enzima T4 DNA ligase a 400 U/ μL (N.E. Biolabs[®]) e 15,83 μL de água ultra-pura esterilizada para completar o volume final de 20 μL . Para que a reação ocorresse, os tubos foram mantidos por 14 h a 16°C e, em seguida, por 20 min. a 65°C, para bloquear a ação da enzima. A etapa de amplificação dos fragmentos constou de apenas uma PCR. Para tanto, foram utilizadas seis combinações de *primers* específicos para as extremidades com adaptadores *EcoRI* e *MseI*, sendo elas: E+A / M+CAC, E+A / M+CAG, E+A / M+CGT, E+A / M+CGC, E+AA / M+AG e E+CG / M+AG. Para esta PCR, foram utilizados: 4 μL de tampão 5x (Promega[®]), 1 μL de cada primer a 5 μM , 2 μL de dNTP a 0,25 mM, 1,2 μL de MgCl_2 a 25 mM, 0,2 μL Taq DNA polimerase a 5 U/ μL (Go Taq, Promega[®]), 4 μL do DNA digerido e ligado e 6,6 μL de água ultrapura esterilizada para completar o volume final de 20 μL .

As amplificações foram feitas em termociclador, marca Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 9700, com o seguinte programa: 1 ciclo a 94°C por 2 min., 35 ciclos de: 94°C por 1 min., 56°C por 1 min. e 72°C por 1 min., e 1 ciclo final a 72°C durante 5 min. A separação dos fragmentos foi feita em gel de poliacrilamida 5% (acrilamida/bisacrilamida 19:1, uréia 7,5 M), em um sistema “Sequi-Gen GT” (Bio Rad[®]) à potência de 80 W durante 5 horas, e corado com solução nitrato de prata 0,2 % (p/v) de acordo com o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

3.5 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS

Os perfis de RAPD e AFLP permitiram a construção de duas matrizes binárias. A análise de agrupamento foi feita pelo programa computacional NTSYSPC (ROHLF, 2000), utilizando o critério SAHN (*Sequential, Agglomerative, Hierarchic, Nonoverlapping clustering methods*), com médias aritméticas, conforme o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Mean*) e o coeficiente de similaridade de Jaccard. A análise de *bootstrapping* foi realizada usando-se o programa Winboot (YAP; NELSON, 1996), com 1000 reamostragens.

Para a análise da variância molecular (AMOVA), a variância total entre os isolados foi subdividida em variância entre origem geográfica (Estados) e hospedeiros dos quais foram coletados cada isolado, utilizando-se o programa Arlequin 2.0 (SCHNEIDER et al. 2000).

Foi realizado, também, um teste de atribuição, pelo programa Structure 2.2.3 (PRITCHARD et al. 2000) através do “BioHPC compute *cluster*” do “Computational Biology Service Unit” (CBSU), disponível on line em <<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/structure.aspx>>. O número de *clusters* foi definido de $K=1$ a $K=13$, conforme o número de Estados onde foram coletados os isolados. Foram feitas 10 interações para cada K usando o modelo “admixture model” e frequências alélicas correlacionadas’, utilizando um período de “burn-in” de 300.000 e 500.000 pelo algoritmo MCMC (*Markov chain Monte Carlo*). Esta estatística revela uma mudança na probabilidade do log, de acordo com o número de K proposto por Evano et al. (2005), ΔK , que foi usado como uma predição do número real de *clusters*.

3.6 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2

Para amplificação e sequenciamento de fragmentos de DNA que codificam RNA ribossomal (ITS1 – 5,8S – ITS2) foram selecionados sete isolados representantes dos grupos formados a partir das análises de agrupamento dos dados gerados por RAPD e AFLP, sendo eles: UNI 40, IBCB 17, CG 138, CG 876, CG 475, CG 1024 e CG 890. Esta análise buscou identificar a espécie dos representantes de cada grupo. Nas reações utilizaram-se os *primers* ITS1 (5’ TCC gTA ggT gAA CCT gCg g 3’) e ITS4 (5’ TCC TCC gCT TAT TgA TAT gC 3’), descritos por White (1990). Estas PCRs foram preparadas em um volume final de 25 μ L contendo 2,5 μ L de tampão 10x (Invitrogen[®]), 0,25 mM de dNTP , 0,4 mM de cada *primer* (ITS 1 e ITS 4), 2 mM de MgCl₂ , 0,2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]), 10 ng da amostra de DNA e 14 μ L de água bidestilada. A reação foi submetida ao termociclador PTC-100 (MJ Reserch, Inc) com o seguinte programa: 1ciclo a 95°C por 4 min., 35 ciclos de: 94°C por 1 min., 57°C por 1 min. e 72°C por 1,5 min., e 1 ciclo final a 72°C durante 5 min. Após a amplificação, os fragmentos

foram separados por de eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,0 % (p/v), corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultra-violeta e fotodocumentado em um sistema de imagem digital LPIX Loccus[®].

O sequenciamento dos fragmentos obtidos acima foi realizado conforme o método proposto por Sanger et al. (1977). Nas reações de sequenciamento dos fragmentos da região ITS foram utilizados os mesmos *primers* das reações de amplificação citadas acima, sendo estas reações realizadas em um volume final de 10 µL, contendo 2 ng do DNA template (fragmentos amplificados), 1,0 mM de *primer* (*forward* ou *reverse*), 4,0 µL do Kit “*DYEnamic ET dye terminator Cycle Sequencing*” (Amershan, Pharmacia Biotech) e 2,0 µL de água ultra-pura. A reação foi submetida ao termociclador “*Mastercycler Gradient*” (Eppendorf[®]) com o seguinte programa: 1X 95°C por 1 min., 35X (95°C por 20 seg., 55°C por 15 seg. e 60°C por 1 min.). A reação foi purificada e as amostras foram submetidas à corrida eletroforética em seqüenciador do tipo “*MegaBace™ 1000 Molecular Dynamics*” (Amershan, Pharmacia Biotech).

As seqüências da região ITS dos sete isolados foram alinhadas com seqüências depositas por REHNER e BUCKLEY (2005) no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através do programa Clustal W (THOMPSON et al.1997). Através do alinhamento foram verificadas as variações presentes nas seqüências da região ITS entre diferentes isolados de *B. bassiana*. O mesmo programa gerou uma árvore filogenética pelo método *neighbour-joining*. O alinhamento gerado através do Clustal W foi sombreado utilizando o programa BOXSHADE disponível em http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.htm

3.7 SELEÇÃO DE BANDA ESPECIFICA E ELUIÇÃO DO MARCADOR EM GEL DE AGAROSE.

Para 17 dos isolados presentes na coleção em estudo foram feitos testes de virulência realizados pelo Laboratório de Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina os dados foram gentilmente cedidos pelo Dr. Pedro J. Neves. A partir desses testes foi

selecionada uma banda específica obtida a partir do gel de RAPD do isolado CG 1024 que apresentou juntamente com os isolados CG 11 e CG 1013 os níveis mais altos de virulência.

A região do gel que continha o DNA marcador foi então recortada e o DNA presente nesta região foi purificado com o kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). Para cada 10 mg de fragmento de agarose foram adicionados 30 µL de tampão de solubilização de gel. Os microtubos foram incubados a 50 °C por 15 minutos. Após a incubação transferiu-se a mistura para um microtubo contendo uma coluna de filtração. Em seguida, centrifugou-se o microtubo contendo a 12.000 rpm por 1 minuto, e o líquido escoado foi descartado. À esta mesma coluna adicionou-se 700 µL de tampão de lavagem. Após 5 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se a centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto. O produto escoado foi descartado. Uma nova centrifugação durante 1 minuto a 12.000 rpm foi necessária para que o resíduo de tampão de lavagem fosse completamente removido. Adicionou-se 50 µL de água aquecida (65 °C) na coluna e esta foi colocada em outro microtubo. Em seguida, o microtubo foi incubado por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos.

3.8 CLONAGEM DO MARCADOR

A clonagem do marcador selecionado foi realizada com o auxílio do Kit “TOPO TA Cloning Kit for Sequencing” (Invitrogen Life Technologies, USA). A ligação do fragmento do DNA marcador foi feita no vetor “TOPO”, misturando-se 4 µL de DNA (4 ng/µL), 1 µL de solução de sal (NaCl 1,2 M; MgCl₂ 0,06 M) e 1 µL do vetor “TOPO” (10 ng/µL). A reação “TOPO cloning” foi incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. A transformação bacteriana foi realizada adicionando-se 2 µL de reação “TOPO cloning” em um frasco contendo células quimicamente competentes (*Escherichia coli* – “ONE SHOT TOPO”). A reação foi incubada em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico por 30 segundos a 42 °C e transferidas imediatamente para o gelo. Logo após adicionou-se 250 µL de meio SOC (Tryptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 10

mM; KCl 2,4 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM; glicose 20 mM) e incubou-se sob agitação (200 rpm) a 37 °C por 1 hora. Em seguida, 50 µL desta solução foram semeados em placas seletivas contendo meio LB - Luria Bertani, (10 g triptona ou caseína hidrolisada; 5 g extrato de levedura; 5 g NaCl; 15 g de ágar; completar o volume para 1000 mL de H₂O destilada esterilizada; pH 6,9) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C. As colônias crescidas foram cultivadas em meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina *overnight* a 37 °C para posterior estocagem e extração de plasmídios.

3.9 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIOS

Uma alíquota das células transformadas (contendo vetor “TOPO” com inserto), foi inoculada em meio LB líquido (5 mL) com 50 µL ampicilina (10 mg/mL) e incubada a 37 °C, 180 rpm, por 12 horas. Em seguida, centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 100 µL de GET (4,6 g glicose 20%; 2,6 g EDTA 0,5 M), homogeneizando-se suavemente. Após esta fase, adicionou-se 100 µL de solução de lise (2 mL NaOH 10 N; 1 mL SDS 10%), homogeneizando e incubando em gelo por 5 minutos. Logo após, foram adicionados 200 µL de solução de neutralização (30 mL KOAc 5 M; 5,75 mL C₂H₄O₂; 14,25 mL água ultrapura). Os tubos foram incubados em gelo por 5 minutos, e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido (400 µL) para um novo tubo, e 2,5 volumes de álcool absoluto foram adicionados. O tubo foi mantido a -20 °C por 15 minutos. Procedeu-se a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos e o descarte do sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 500 µL de álcool 70% na parede do tubo, e o sobrenadante novamente descartado. Após a secagem do DNA, o mesmo foi ressuspendido em 50 µL de água ultrapura. Nesta fase adicionou-se 7 µL de RNase (100 ng/µL) e incubou-se por 15 minutos a 37 °C. Após este período, foram adicionados 50 µL de clorofane, e o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. A fase superior foi transferida para um novo microtubo onde foi acrescentado 5 µL (1/10 do volume) de NaCl 3 M juntamente com 100 µL de etanol absoluto

resfriado (2 volumes), sendo mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma hora. Em seguida, centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 100 μL de etanol 70%, sendo este descartado logo após. Após a secagem, o sedimento foi ressuspensão em 20 μL de água ultrapura.

3.10 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO CLONADO

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger et al. (1977) utilizando-se os *primers* M13F (5' gTA AAA CgA Cgg CCA g 3') ou M13R (5' CAg gAA ACA gCT ATg AC 3'). As reações foram feitas em um volume final de 10 μL , contendo 2,0 μL de DNA da amostra (100 ng/ μL), 2,0 μL de *primer* M13F ou M13R (3 pM/ μL) e 4,0 μL do kit "DYEnamic ET dye terminator Cycle Sequencing" (Amershan, Pharmacia Biotech) e 2,0 μL de água ultrapura. A reação foi submetida a um termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf), previamente programado para 35 ciclos após desnaturação inicial de 1 minuto a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada ciclo de amplificação foi constituído de três etapas: desnaturação ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 seg.), pareamento ($55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 seg.) e extensão ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min).

3.11 LAVAGEM DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Após a amplificação, foi realizada a lavagem da reação de sequenciamento. Foram adicionados 65 μL de etanol 96% e 2 μL de acetato de amônio 7,5 M. O material foi mantido à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se por 45 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante por inversão da placa, procedeu-se, com a placa invertida sobre papel toalha, um pulso a 300 rpm por 5 segundos. Em seguida, colocou-se 140 μL de etanol 70%, e centrifugou-se por 10 min. a 4.000 rpm, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos até a completa secagem. O

DNA foi ressuspenso em 10 µL de água ultrapura, e em seguida este foi submetido à leitura em sequenciador do tipo “MegaBace™ 1000 *Molecular Dynamics*” (Amershan, Pharmacia Biotech). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 60 segundos. A condição de eletroforese foi de 6 Kv por 230 minutos.

3.12 ESTUDO DAS SEQUENCIAS OBTIDAS

A qualidade das seqüências foi analisada com auxílio do pacote computacional “Phred/Phrap/Consed”. As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no “Banco de Dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia” (NCBI), com o auxílio da ferramenta “BLAST Search” (ALTSCHUL et al. 1990).

3.13 DESENHO DE *PRIMERS*

Através do programa “GeneRunner” versão 3.05 (<http://www.generunner.com>), foram desenhados *primers* capazes de reconhecerem as extremidades do fragmento clonado, correspondente ao isolado CG 1024. Os *primers* foram desenhados estendendo as seqüências de nucleotídeos dos *primers* utilizados na reação de RAPD na qual a banda contendo o DNA marcador de interesse foi eluída. Os oligonucleotídeos desenhados a partir dos fragmentos de DNA selecionados por RAPD foram designados como: 1024 - F (5'TGC GGC TGA GGA GGA CT 3') e 1024 - R (5' TGC GGC TGA GTG TAG AAC 3'), usados para ampliações de fragmentos genômicos específicos para o isolado selecionado.

3.14 PCR ESPECÍFICA

As reações de amplificação foram preparadas com um volume final de 25 μL , contendo 2,5 μL de tampão 10x (Invitrogen[®]), 0,25 mM de dNTP , 0,4 mM de cada *primer* (1024 F e 1024 R), 2 mM de MgCl_2 , 0,2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]), 10 ng da amostra de DNA e 14 μL de água bidestilada. A reação foi submetida ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) previamente programado para 30 ciclos após desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C. Cada ciclo de amplificação foi constituído de três etapas: desnaturação (94 °C, 1 min.), pareamento (60 °C, 1 min.) e extensão (72 °C, 1 min.). Ao final dos 30 ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1,0%, corados com brometo de etídio e fotografados em fotodocumentador LPIX Loccus[®].

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTUDO DA ESTRUTURA DA POPULAÇÃO DE *B. BASSIANA*

A partir dos *fingerprints* de DNA gerados pela técnica RAPD, obteve-se, para os 42 isolados de *B. bassiana*, 50 locos dos quais 46 mostraram-se polimórficos e quatro monomórficos, apresentando, desse modo, 92% de polimorfismo entre os locos analisados. O perfil molecular gerado por cada um dos cinco *primers* mostrou-se variável entre os isolados (Figura 1). Resultado semelhante foi encontrado por Carneiro et al. (2008) que em um estudo com 24 isolados de *B. bassiana* detectou somente cinco locos monomórficos de um total de 72 analisados, representando um polimorfismo de 93% entre os locos avaliados.

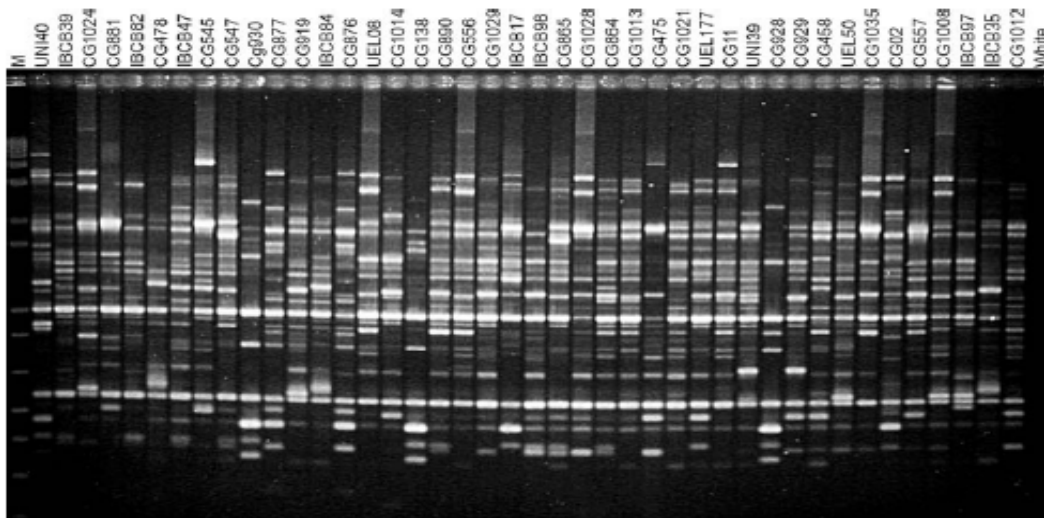


Figura 1 – Gel de agarose mostrando o *fingerprint* gerado por *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) utilizando-se o *primer* OPE 14; Canaleta M, marcador de peso molecular 1 kb plus – DNA Ladder

Com os *fingerprints* de DNA gerados pela técnica AFLP, foram detectados 149 locos polimórficos e somente 20 locos monomórficos, demonstrando novamente um alto polimorfismo (88%) entre os isolados (Figura 2). Em um trabalho realizado por Devi et al. (2006), através da leitura de dados obtidos por AFLP foram

930, os quais através do AFLP foram discriminados em 4 grupos: AFLP GII (CG 876 e CG877), AFLP GIII (CG138, CG928, CG930), AFLP GIV (IBCB17), AFLP GV (UNI40). Apesar de que maior poder de resolução tenha sido obtido com os marcadores de AFLP, provavelmente em decorrência do maior número de locos analisados, alta concordância dos agrupamentos gerados a partir dos marcadores de RAPD e AFLP foi observada.

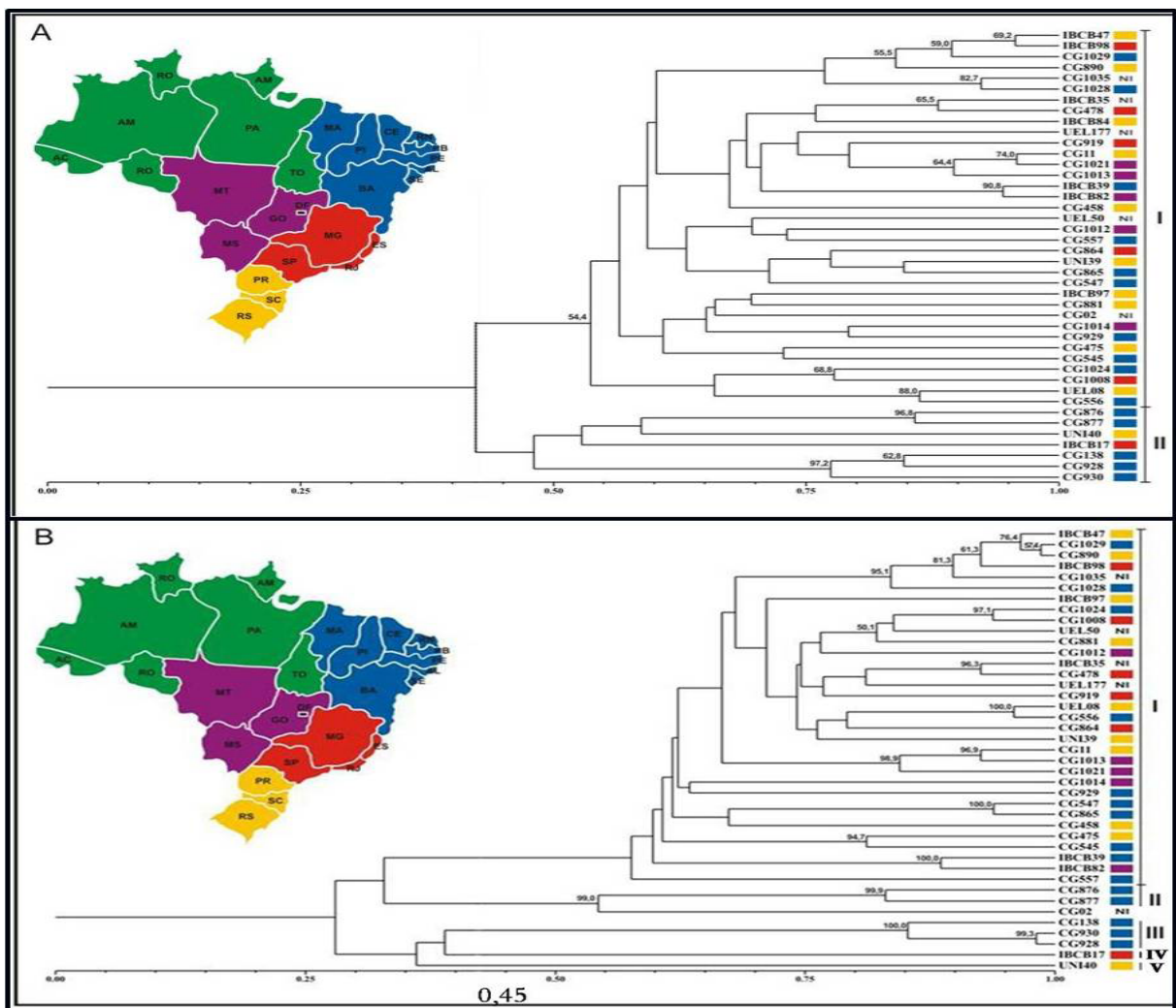


Figura 3 – Dendrogramas gerados a partir dos dados de similaridade genética entre isolados de *B. bassiana*, agrupados de acordo com o método UPGMA, usando locos obtidos por RAPD (A) e AFLP (B). As regiões de cada isolado estão representadas pelas cores correspondentes ao mapa. Os valores de *bootstrap* maiores que 50%, obtidos de 1000 reamostragens, estão indicados nos nós.

É possível observar através da análise de agrupamento que há formação de agrupamentos com valores de *bootstrap* elevados que contém isolados

provenientes de uma mesma região geográfica como o grupo formado pelos isolados CG 928 e CG 930, ambos da região nordeste, agrupados com um valor de *bootstrap* de 99.3.

No entanto, a maioria das isolados representantes dos grupos obtidos são provenientes de diferentes regiões, sendo verificado, inclusive, que existem isolados provenientes de origens geográficas distantes com um alto nível de similaridade, como por exemplo, os isolados IBCB 47 e CG 1029, provenientes do sul e nordeste, respectivamente, com 92% de similaridade genética (Figura 3B). Resultado semelhante foi obtido em um trabalho realizado por Muro et al. (2003), onde ficou demonstrado que dois isolados de *B. bassiana* coletados de diferentes insetos e provenientes de regiões distantes do Brasil (Mato Grosso e Amazonas) apresentaram similaridade de 82%. Diversos trabalhos buscaram relacionar a variação molecular entre isolados de *B. bassiana* à origem geográfica, sendo que há trabalhos onde foi encontrada tal associação (GLARE; INWOOD, 1998; BIDOCHKA et al. 2002; WANG et al. 2003; FERNANDES et al. 2009) e outros trabalhos onde nenhuma correlação entre isolados e as origens geográficas foi observada (BERRETTA et al. 1998; GAITAN et al. 2002; MURO, 2003).

A análise da variância molecular (AMOVA), realizada separadamente para os dados gerados por RAPD; AFLP, foi capaz de confirmar, em nosso trabalho, a ausência de correlação entre isolados e origem geográfica. A AMOVA demonstrou ainda não haver correlação entre os isolados e seus respectivos hospedeiros, uma vez que em todas as análises foram obtidos valores de “p” não significativos.

Quanto à ausência de associação com o hospedeiro, resultado semelhante foi encontrado por Coates et al. (2002) que também demonstrou através da Análise da Variância Molecular ausência de correlação significativa entre o haplótipo de *B. bassiana* e sua gama de insetos hospedeiros.

Segundo Bidochka et al. (2002) existe um paradigma na patologia que assume que o genótipo de fungos entomopatogênicos esteja associado à determinado táxon de inseto hospedeiro o qual o fungo contamina havendo, desse modo, uma tendência em concentrar a atenção na interação entre o patógeno e seu hospedeiro sem avaliar inteiramente o papel de fatores ambientais, sendo a fase patogênica do fungo o foco de muitos estudos. Desse modo muitos trabalhos foram realizados propondo a associação entre *B. bassiana* e hospedeiro (COUTEAUDIER;

VIAUD, 1997; MAURER et al.1997; URTZ; RICE, 1997; BERRETTA et al. 1998; GAITAN et al. 2002). No entanto, limitada evidência tem sido produzida para sugerir que os grupos genéticos de *B. bassiana* têm co-evoluído com o hospedeiro (GLARE, 2004). Outros trabalhos utilizando as mesmas técnicas, mas diferentes conjuntos de isolados não encontraram correlação estatisticamente significativa entre genótipo e hospedeiro (MAURER et al. 1997; URTZ; RICE, 1997; COATES et al. 2002). A conclusão geral dos estudos mais recentes é que *B. bassiana* são entomopatógenos não especialistas e sem nenhuma associação filogenética particular no que diz respeito à especificidade ao hospedeiro (WANG et al. 2003; REHNER; BUCKLEY, 2005, MEYLING, 2009).

Apesar de alguns grupos obtidos na análise de agrupamento não apresentarem valores de *bootstrap* elevados, o teste de atribuição corrobora com a análise de agrupamento e reforça os dados obtidos.

O teste de atribuição mostrou, conforme o modelo proposto por Evano et al. (2005), que o valor de K mais adequado para os dados de RAPD é igual a 2 e para os dados de AFLP é igual a 3. Ou seja, os isolados de *B. bassiana* foram atribuídos a 2 *clusters* genotípicos quando considerados os dados de RAPD, e 3 *clusters* genotípicos quando analisados por AFLP. Cada *cluster* está representado por uma cor diferente como ilustrado na Figura 4, e, como comparação, o *cluster* verde de ambos os gráficos representa o grupo I de ambos os dendrogramas. Neste teste de atribuição, o caso do isolado CG02 citado na análise de agrupamento também se repete, ou seja, no gráfico A ele pertence ao *cluster* verde, já no gráfico B ele pertence ao *cluster* azul.

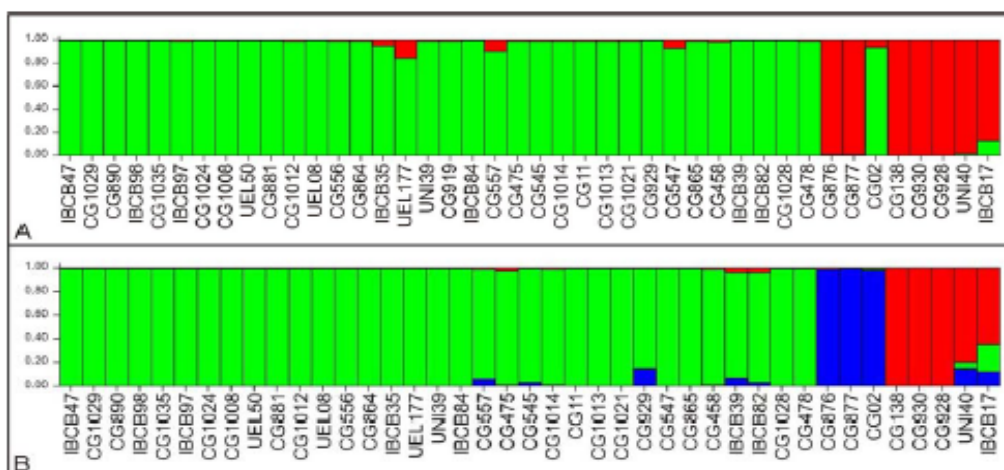


Figura 4 – Gráficos resultantes dos testes de atribuição, realizados pelo o *software Structure 2.2*, a partir dos dados gerados por RAPD (A) e AFLP (B). Cada barra vertical representa um isolado e cada cor representa um *cluster*. A coordenada Y mostra o coeficiente de participação (Q) de um isolado no *cluster*.

Uma informação adicional encontrada através do teste de atribuição diz respeito à participação de cada isolado em determinado *cluster*. Grande parte dos isolados apresentou valores de Q próximos a 100%, ou seja, participam de apenas um dos *clusters*. Em poucos isolados foi observada uma pequena participação (Q menor que 44 %) em um segundo ou terceiro *cluster*. Isto pode sugerir pouco fluxo gênico entre as populações.

A partir do alinhamento de sequências de nucleotídeos de 445 pb obtidos do sequenciamento da região ITS do DNAr de 7 isolados, representantes dos diferentes grupos, foi possível distinguir os isolados pertencentes ao *cluster* vermelho dos demais *clusters* (verde e azul).

Através do alinhamento observou-se que os isolados IBCB 17, CG 138 e UNI 40, representantes do *cluster* vermelho do teste de atribuição, apresentaram uma substituição de Timina por Citosina na posição 180. Foi observado também que os isolados CG 138 e UNI 40 apresentaram duas variações adicionais, sendo uma substituição de citosina por timina na posição 382 e guanina por adenina na posição 403. Essas variações não estiveram presentes no isolado IBCB 17, que apresentou nas posições 382 e 403 nucleotídeos presentes nos demais isolados representantes dos *clusters* verde e azul do teste de atribuição. Desse modo, o isolado IBCB 17 apresentou uma modificação que o agrupou

juntamente com os isolados UNI 40 e CG 138, representantes do *cluster* vermelho, mas também compartilhou polimorfismo de base única (SNPs) com os demais *clusters*. Isso pode ser explicado pela participação considerável do isolado IBCB 17 tanto no *cluster* verde e azul (Q igual a 40%, aproximadamente) quanto no *cluster* vermelho (Q igual a 60%, aproximadamente) Figura 4B.

Segundo Rehner e Buckley (2005), as seqüências de nucleotídeos da região ITS permitem identificar seis clados (A ao F) dentro do gênero *Beauveria*. Interessantemente os isolados de *B. bassiana* ocupam dois clados (A e C). A distância filogenética entre estes dois clados da mesma espécie, *B. bassiana*, chega a ser maior do que cada um deles com o clado que é representado pela espécie *B. brongniartii*. Segundo os autores a morfologia convergente dos conídios produzidos por membros do clado A e C demonstra certa confusão taxonômica quanto aos caracteres morfológicos e não evidenciam a real diversidade da espécie dentro destes grupos. Sugerem, portanto, que os especialistas no gênero *Beauveria* selecionem um neótipo do clado A ou C para a descrição de uma segunda espécie. Na opinião do autor, o clado A deve manter a designação *B. bassiana*, uma vez que diversas isolados estudadas para controle biológico e inúmeras isolados comercialmente registradas para uso no biocontrole foram dispostas filogeneticamente no clado A.

Frente a este quadro, as seqüências da região ITS obtidas no presente trabalho foram alinhadas com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (REHNER; BUCKLEY, 2005), e utilizadas para a construção de uma árvore filogenética (Figura 5). Todas as seqüências obtidas no presente trabalho, e que representam 42 isolados brasileiros, se enquadraram em um mesmo clado, ou seja, o clado A de *Beauveria bassiana*.

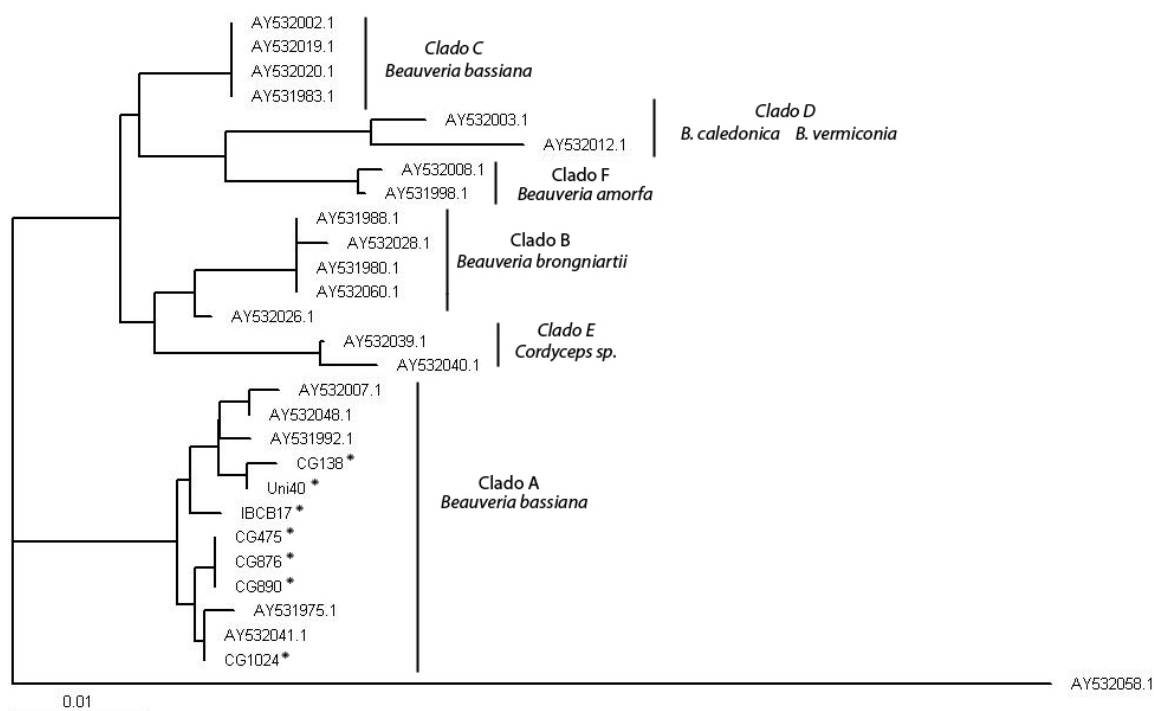


Figura 5 – Arvore filogenética gerada a partir das seqüências da região ITS1 – 5,8S – ITS2 de isolados de *B. bassiana* através do programa CLUSTAL-W pelo método neighbour-joining. As seqüências obtidas no presente trabalho são dos isolados marcados com asterisco. As demais seqüências foram obtidas do banco de dados do NCBI e estão identificadas conforme o número de acesso.

4.2 DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR ISOLADO-ESPECÍFICO

Características morfológicas são insuficientes para distinguir os diferentes isolados de *B. bassiana*, o que inviabiliza o uso exclusivo deste tipo de caráter para monitoramento a campo desses agentes de controle biológico (CASTRILLO et al. 2003). Os marcadores moleculares multilocos, por outro lado, permitem melhor distinção entre os isolados fúngicos e conseqüentemente o desenvolvimento de marcadores PCR específico para um dado isolado.

Dentre os 42 isolados de *B. bassiana* estudados neste trabalho, um total de 17 (CG 1013, CG 1024, CG 11, CG 864, CG 475, CG 890 CG 138, CG 877, CG 545, CG 557, CG 876, CG 1028, CG 458, CG 547, CG 556, CG 865 e UNI 40)

teve seu nível de virulência a *Cosmopolites sordidus* avaliado pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, da Universidade Estadual de Londrina. Os isolados CG 1024, CG 11 e CG 1013 apresentaram níveis de virulência significativamente superiores aos demais isolados ensaiados (LEMA LÓPEZ, 2010).

A comparação dos perfis de RAPD derivados dos 42 isolados permitiu detectar um produto de amplificação, obtido a partir do primer OPE- 14, exclusivo do isolado CG 1024. Este DNA detectado no isolado CG 1024, mas não revelado nos demais isolados de *B. bassiana*, foi clonado e seqüenciado. A seqüência obtida foi utilizada para desenhar os *primers* 1024F₈₃₈ (5'TGC GGC TGA GGA GGA CT 3') e 1024R₈₃₈ (5' TGC GGC TGA GTG TAG AAC 3'), para serem utilizados, respectivamente, como forward e reverse, em PCRs específicas. Com o uso das condições de PCR descritas em Material e Métodos, o par de primer desenhado no presente estudo produziu um produto de amplificação de 838 pb quando utilizado DNA molde do isolado CG 1024. Nenhum produto de amplificação, como de interesse, foi obtido quando utilizado DNA de quaisquer outros isolados estudados neste trabalho. (Figura 6)

Desse modo, o método descrito neste estudo representa um procedimento simples e rápido para identificação do isolado específico e seu monitoramento em campo. Este é o primeiro trabalho que desenvolve um marcador molecular específico para monitoramento de *B. bassiana* no campo.

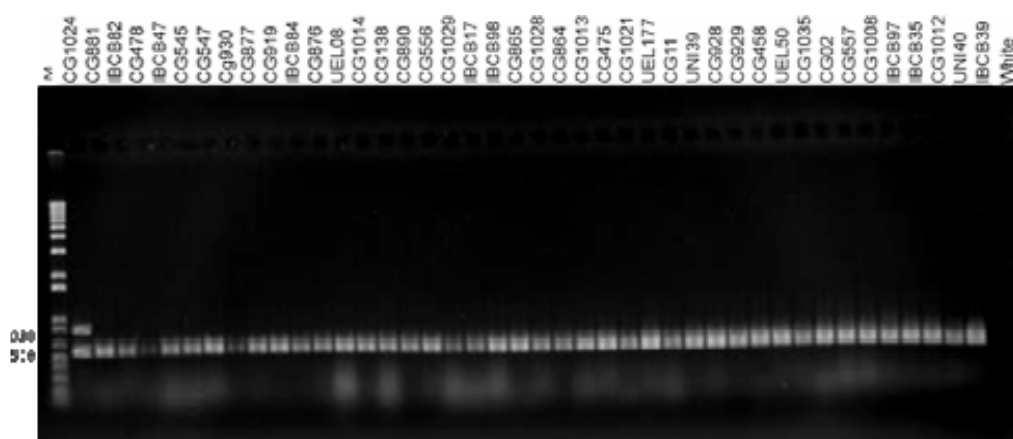


Figura 6 – Detecção do isolado CG 1024 baseada em PCR específica utilizando os primers 1024F₈₃₈ e 1024R₈₃₈ correspondente ao fragmento de 838pb indicado. Coluna M, marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder. Fragmento de 580 pb correspondente a amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2, utilizadas como controle positivo para todos os isolados.

5 ARTIGO

5.1 GENETIC VARIABILITY OF *BEAUVERIA BASSIANA* AND DEVELOPMENT OF AN ISOLATESPECIFIC MARKER

GENETIC VARIABILITY OF *BEAUVERIA BASSIANA* AND DEVELOPMENT OF AN ISOLATESPECIFIC MARKER

Este artigo apresenta-se nas normas de publicação do periódico Brazilian Journal of Microbiology.

GENETIC VARIABILITY OF *BEAUVERIA BASSIANA* AND DEVELOPMENT OF AN ISOLATESPECIFIC MARKER

DV Ferri^a, CF Munhoz^b, MLC Vieira^b, Neves, PMO, Fungaro, MHP

Abstract

Among the pests that attacks the banana crop is the insect (Coleoptera) *Cosmopolites sordidus*. Using the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* as a biological control agent for this pest can help to reduce the use of chemical insecticides on the banana crop. In this study, the genetic variability of a collection of Brazilian isolates of *B. bassiana* was evaluated. Specimens were obtained from various geographic regions of Brazil and from different hosts of the *Curculionidae* family. Based on the DNA fingerprints generated by RAPD and AFLP, we obtained 92% and 88% of polymorphic loci respectively. The *B. bassiana* isolates were attributed to 2 genotype *clusters* based on the RAPD data, and 3 genotype *clusters* when analyzed by AFLP. The sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the ribosomal DNA *cluster* allowed us to identify the isolates belonging to clade A of *B. bassiana*. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that variability among the isolates was not correlated with the geographic origin or the hosts. A specific RAPD marker for isolate CG 1024, highly virulent to *C. sordidus*, was cloned and sequenced. Based on the sequences obtained, specific PCR *primers* 1024F₈₃₈ (5'TGC GGC TGA GGA GGA CT 3') and 1024R₈₃₈ (5' TGC GGC TGA GTG TAG AAC 3') were designed for detecting and monitoring the above isolate in the field.

Keywords: *Beauveria bassiana*. RAPD, AFLP. Molecular marker. *Cosmopolites Sordidus*.

Introduction

The banana (*Musa sp*) is the most cultivated and consumed fruit in the world. Its cultivation has an economic and social impact in various countries where it is grown by small, medium and large-scale rural producers. In global terms, Brazil is the second biggest producer of bananas. One of the problems of banana crops is the presence of pests which limit production and affect fruit quality. Of all

^a Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral, PO Box 6001, 86051-970 Londrina, Brazil

^b Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Genética, PO Box 83, 13400-970 Piracicaba, Brazil;

these pests, one of the most severe is *Cosmopolites sordidus*, an insect (Coleoptera) belonging to the Dryophthoridae family and popularly known as the banana rhizome weevil. The damage caused by this insect is mainly attributed to the larval form, which bores through the banana rhizome. The holes formed harm the plants, rendering them more likely to fall. In addition, the holes in the rhizome also cause indirect damage since they allow pathogens to penetrate the areas attacked, which can kill the plant (26).

The main method used to control the rhizome weevil is chemical control, but the insecticides used are highly toxic and usage is restricted because they leave residues on the fruit. In an attempt to reduce the use of chemical insecticides on the banana crop, various studies on entomopathogens for controlling *C. sordidus* have been carried out, and the best control agent identified as the filamentous fungus *Beauveria bassiana* (1, 2, 4, 23). This genus has ample genetic variability, facilitating studies aimed at selecting the most virulent isolates for controlling *C. sordidus* (3) and the best adapted to the climatic conditions in the region in which it is to be applied. Among the 32 products based on entomopathogenic fungi commercially available in Brazil, 20% are based on *B. bassiana* (28).

In an interesting paper by Rehner and Buckley (32), morphological and molecular methods of investigating the diversity of *Beauveria* were compared. The results obtained using molecular methods allowed visualization of six clades (A to F) within the *Beauveria* genus. Interestingly, the isolates of *B. bassiana* were distributed in two clades (A and C). The A clade consisted of globally distributed isolates of *B. bassiana* and also included the teleomorph *Cordyceps staphylinidaecola*. However, all isolates in the C clade were *B. bassiana* originating from Europe and North America. Although the A and C clades were molecularly distinct, in terms of morphological characters, both are characterized as *B. bassiana*. The convergent morphology of the conidia produced by members of the A and C clades exhibited some taxonomic confusion as to morphological characters and did not show any real species diversity within these groups. Although *Beauveria* is morphologically distinguishable as a genus, identifying its species is difficult because of its structural simplicity and the lack of distinctive phenotypic variation. Similarly, morphological phenotypic characteristics are insufficient to differentiate the various

isolates of *Beauveria*, rendering it unsuitable for monitoring as a biological control agent in the field (8).

The use of molecular tools has contributed to gaining a better understanding of the genetic structure of the population, genetic flow and the potential ecological impact of using a microorganism as a biological control agent. In addition, multi-locus molecular markers have helped in accurately identifying isolates, whether for patenting purposes or for monitoring persistence and behavior of an isolate after release into the environment. For the reasons outlined above, the study was aimed at using RAPD and AFLP markers to analyze the genetic variability of a Brazilian collection of isolates of *B. bassiana* and developing an isolate-specific marker for environmental monitoring of an isolate (CG 1024) highly virulent to *C. sordidus*.

Material and Methods

Biological Material

The biological material used in this study was a collection of 42 isolates of the fungus *B. bassiana* obtained from various geographic regions of Brazil and different hosts of the *Curculionidae* family. These isolates are among the Entomopathogenic Fungi Collection at the State University of Londrina and EMBRAPA/CENARGEN (Table 1).

Extraction of Genomic DNA

To extract the nucleic acids, each isolate was grown in Pontecorvo's liquid medium for 48 h at 28°C (30). The resulting mycelium was harvested by filtration. To extract the DNA, 0.5g of frozen mycelium was ground to a fine powder in liquid nitrogen and quickly transferred to a 2 mL microcentrifuge tube with 800 µl of DNA extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH8.0; 25 mM EDTA, 1% SDS, 25 mM NaCl) at 65°C for 20 min. The suspension was deproteinized by extracting once with an equal volume of phenol and once with an equal volume of chloroform: isoamylalcohol (24:1). DNA was precipitated by adding two volumes of ice-cold ethanol and 10% 3M NaCl. The precipitate was collected by centrifuging, washed

with 70% ethanol, dried and resuspended in TE (10 mM Tris–HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) with RNase (10 mg ml⁻¹) for 60 min at 37°C.

RAPD analysis

The RAPD procedures used were as described by Fungaro et al. (17). The OPX 7, OPX 13, OPE 11, OPE 14 and OPE 15 random *primers* were purchased from Operon Technologies, Alameda, CA, USA. Amplifications were carried out in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf).

Aflp analysis

AFLP markers were amplified according to the protocol described by Lopes et al. (24), modified from Vos et al. (39). Briefly, 12.5 ng of genomic DNA from each isolate were double digested with *EcoRI* (NE Biolabs, Ipswich, MA, USA) and *MseI* (Promega) enzymes (6 U of each) in 20 µl of reaction solution with 1 X One Phor-All buffer (Amersham), 1 X BSA (NE Biolabs) and ultra pure water q.s.p. for 4 h at 37°C. Reactions were terminated by heat inactivation (65°C for 20 min). All resulting fragments were ligated to adapter sequences by adding 1 X T4 DNA ligase reaction buffer, 2.5 µM of *EcoR* I adapter (denoted E), 2.5 µM of *Mse* I adapter (denoted M), 67 U of T4 DNA ligase (NE Biolabs) and ultra pure water q.s.p. 20 µl. Ligation reactions were incubated at 16°C for 14 h and terminated as described above. *Primers*, complementary to the adapters, with two selective nucleotides at the 3' end were used for selective amplification. The 20 µl PCR mix contained 1X reaction buffer, 0.25 µM of each primer, 0.25 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1 U of Go Taq Flexi Promega® and 5 µl of the adapter-ligated DNA. PCR conditions were as follows: 94°C for 2 min, 35 cycles at 94°C for 1 min, 56°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 5 min in a Gen Amp® PCR System 9700 thermocycler. Samples (2 µl) of amplified products were denatured with 1X loading buffer (0.2% each of bromophenol blue and xylene cyanol, 10 mM EDTA and 95% formamide at pH 8.0) at 95°C for 5 min before they were loaded onto the gels. AFLP bands were resolved in 5% w/v denaturing polyacrylamide gels (19:1; acrylamide:bis

acrylamide) using Sequi-Gen GT electrophoresis apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 5 h at 80 W, and visualized by silver staining according Creste et al. (11).

Sequencing of The rDNA (ITS1-5.8S-ITS2 region)

The ITS1-5.8S-ITS2 DNA fragments of the UNI 40, IBCB 17, CG 138, CG 876, CG 475, CG 1024 and CG 890 isolates were amplified using the primer pairs described by White et al. (41). Amplifications of the ITS1-5.8S-ITS2 region from the DNA of isolates UNI 40, IBCB 17, CG 138, CG 876, CG 475, CG 1024 and CG 890 were performed using the ITS1(forward) and ITS4 (reverse) *primers* (41). The PCR products were sequenced according to Sanger et al. (34). The sequencing reaction comprised 2.0 µl of ITS1 or ITS4 primer (Invitrogen, Life Technologies, USA, 3.0 pmol/µl), 4.0 µl of premix of DYEnamic ET terminator (Amersham Biosciences) and 2.0 µl of the rDNA amplification product (100 ng/µl). The reaction was submitted to a Mastercycler thermocycler gradient (Eppendorf), programmed to perform 35 cycles after initial denaturation (95 °C, 1 min). Each cycle consisted of three steps: denaturation (95 °C, 20 s), annealing (55 °C, 15 s) and elongation (60 °C, 1 min). Sequencing was performed on a MegaBACETM 1000 sequencer (Amersham Biosciences). The quality of the sequences was examined using the Phred/Phrap/Consed package. Sequences were aligned with sequences deposited by REHN and BUCKLEY (2005) in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using BioEdit version 1.6.6 (21). Phylogenetic analyses were performed using the ClustalW multiple-sequence alignment program, version 1.6 (37).

Development of Specific *Primers*

One of the RAPD amplification products present in CG 1024 isolate and absent in all other *B. bassiana* isolates analyzed in the present study was excised from the gel and purified using the “GFX™ PCR DNA kit and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). The resulting DNA was cloned using the TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen Life Technologies, USA). The recombinant plasmid was purified using the CONCERT™ rapid plasmid miniprep system

(Invitrogen Life Technologies, USA). The insert was sequenced using the DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) on MegaBACE 1000. The specific *primers* were designed using the Gene Runner program, version 3.05 (<http://www.generunner.com>). PCR conditions using the primer pair designed were optimized and then tested for the 42 isolates obtained from different regions and hosts. Positive controls of PCR reaction were prepared replacing the specific *CG 1024* primer pair for rDNA *primers* ITS1 and ITS4 (41). The reaction was submitted to a Mastercycler thermocycler gradient (Eppendorf). The cycling conditions were as follows: 35 cycles after initial denaturation (95 °C, 2 min). Each cycle consisted of three steps: denaturation (95 °C, 1 min), annealing (62 °C, 1 min) and elongation (72 °C, 1 min). At the end of the cycles, there was a final elongation step (72 °C, 5 min).

Statistical treatment of AFLP and RAPD data.

Data were scored for the presence (1) or absence (0) of amplification products by means of indicator variables. This type of scoring was done for each locus across all 42 isolates of *B. bassiana*. Pairwise comparisons of isolates based on shared and unshared amplicons were used to generate similarity coefficients (22). Dendrograms were generated based on the unweighted pair group method with arithmetical averages (UPGMA), employing the sequential, agglomerative, hierarchic and nonoverlapping (SAHN) *clustering* methods. The NTSYS-PC statistical package (33) was used for computations. Bootstrap analysis with 1000 re-samples was completed with Winboot (42) to determine the confidence limits of the UPGMA dendrogram. For analysis of molecular variance (AMOVA), the total variance among the isolates was divided into variance between geographic origin (states) and hosts from which the isolates were collected, using Arlequin 2.0 software (36). Each isolate was probabilistically-assigned to a genetically distinct *cluster* based on Bayesian models using Structure 2.2.3 (31), available online from Cornell University at <http://cbsuapps.tc.cornell.edu/structure.aspx>. The number of *clusters* was set from $K = 1$ to $K = 13$, as the number of states where the isolates were collected. Ten interactions were performed for each K using the admixture model and correlated allele frequencies, using a burn-in period of 300,000 and 500,000 based on the MCMC algorithm (Markov Chain Monte Carlo). This statistic shows a change in the

probability of the log according to the number of K proposed by Evano et al. (15), ΔK , which was used as a prediction of real number of *clusters*.

Results and Discussion

Genetic variability

Among the 50 RAPD loci generated with five random decamer *primers*, 92% were polymorphic (Fig 1). Accordingly, a high level of polymorphism was also found using the AFLP technique. Out of the 149 bands obtained by this technique and using six different primer combinations in the selective PCR, 20 (88%) were polymorphic (Fig 2). A phenetic dendrogram based on RAPD data grouped the accessions into two *clusters* (Fig 2). However, the dendrogram generated by the AFLP markers revealed five major phenetic groups (Fig 3). RAPD group I (RAPD GI) consisted of 37 isolates, ie. 88% of the isolates analyzed. RAPD group II (RAPD GII) consisted of the 7 remaining isolates. Similarly, AFLP group I (AFLP GI) contained the most accessions, 36 isolates representing 85.7% of total. The isolates belonging to group I of both dendrograms are the same, with the exception of isolate CG02 which was allocated to group II when the AFLP data was taken into account. RAPD group II (RAPD GII) consisted of isolates CG876, CG877, UNI 40, IBCB 17, CG 138, CG 928 and CG 930, which, using AFLP, were differentiated in 4 groups: AFLP GII (CG 876 and CG877), AFLP GIII (CG138, CG928, CG930), AFLP GIV (IBCB17), AFLP GV (UNI40).

In accordance with the model proposed by Evano et al. (15), the attribution test showed that the value of K most appropriate to the RAPD data is 2, and for the AFLP data, 3. In other words, the isolates of *B. bassiana* were attributed to 2 genotype *clusters* based on the RAPD data, and 3 genotype *clusters* based on AFLP analysis. Each *cluster* is represented by a different color, as shown in Figure 4, and, for comparison, the green *cluster* in both graphics represents group I of both dendrograms. In this attribution test, the case of isolate CG02, mentioned in the grouping analysis, is also repeated, ie. in graphic A it belongs to the green *cluster*, whereas in graphic B it belongs to the blue *cluster*.

Based on a 445-bp nucleotide sequence alignment obtained from sequencing the ITS region of the rDNA of 7 isolates representing the different groups,

it was possible to differentiate the isolates belonging to the red *cluster* from those in the other *clusters* (green and blue). By aligning the sequences, it was observed that isolates IBCB 17, CG 138 and UNI 40, placed by the attribution test in the red *cluster*, showed substitution of Thymine by Cytosine in position 180. We also observed that isolates CG 138 and UNI 40 exhibited two additional variations: substitution of Cytosine by Thymine in position 382 and Guanine by Adenine in position 403 (Figure 5). These variations were not found in isolate IBCB 17, which had nucleotides in positions 382 and 403 present in the other isolates representing the green and blue *clusters* in the attribution test. Thus, isolate IBCB 17 exhibited a modification that grouped it with isolates UNI 40 and CG 138, representing the red *cluster*, but also shared single-nucleotide polymorphisms (SNPs) with the other *clusters*. This can be explained by the significant participation of isolate IBCB 17 both in the green and blue *clusters* (Q = 40%, approx.), as well as in the red *cluster* (Q = 60%, approx.) (Figure 4B).

The sequences of the ITS region obtained in this study were aligned with the sequences deposited in the NCBI database (32), and used to build a phylogenetic tree (Figure 5). All the sequences obtained in this study, representing 42 Brazilian isolates, fall into the same clade, ie. clade A of *B. bassiana*.

Analysis of molecular variance (AMOVA) carried out separately on the data generated by RAPD and AFLP showed that the variability among the isolates is not correlated with geographic origin or with the host (percentage of variation among the populations of less than 0.72). These results indicate that the genetic diversity of the isolates of *B. bassiana* is not distributed among the different hosts of *B. bassiana*, nor among the different origins of the isolates, since there is no pattern in the structuring of the *B. bassiana* population based on these data.

Development of isolate-specific molecular marker

Among the 42 isolates of *B. bassiana* studied, a total of 17 were submitted to a group of researchers at the Insect Microbial Control Laboratory of the State University of Londrina to evaluate virulence to *Cosmopolites sordidus*. Isolates CG 1024, CG 11 and CG 1013 exhibited levels of virulence significantly higher than the other isolates assayed (P.M.O.J. Neves, personal communication). Comparison of the RAPD profiles derived from the 42 isolates led to detection of an amplification

product, obtained from the OPE-14 primer, exclusive to isolate CG 1024. This DNA detected in isolate CG 1024, but not revealed in the other isolates of *B. bassiana*, was cloned and sequenced. The sequence obtained was used to design the 1024F₈₃₈ (5'TGC GGC TGA GGA GGA CT 3') and 1024R₈₃₈ (5' TGC GGC TGA GTG TAG AAC 3') primers, to be used as forward and reverse in specific PCRs. Using the PCR conditions described in MATERIAL AND METHODS, the primer pair designed in this study produced an amplification product of 838 bp when the mold DNA of isolate CG 1024 was used. No amplification product of any interest was obtained using the DNA of any of the other isolates studied (Figure 7).

Discussion

Where phenotypic characteristics are neither sufficient to distinguish different *Beauveria* isolates, nor adequate to monitor field releases of biocontrol agents, genome fingerprints have often been used. Most of the methods employed to characterize genotypic variations in fungi are based on PCR. Among them, RAPD markers (5, 7, 13, 14, 18, 20, 25, 35), and AFLP markers (16, 29) have been successfully employed to assess the genetic variability of *Beauveria* spp. In the present study, we observed different DNA patterns for all 42 isolates of *B. bassiana* revealed by RAPD and AFLP. Although *B. bassiana* is a haploid fungus with predominantly asexual reproduction, high levels of genetic polymorphism (in the order of 90%) were found using both techniques (RAPD and AFLP). Probably the high level of genetic variation found in the present study is due to the fact that the isolates were collected from several different geographic areas and insect hosts. High levels of genetic variability among *B. bassiana* using multi-locus markers were also observed by other authors (5, 7, 12)

At genetic similarities of 0.45, the dendrogram generated by RAPD markers revealed two major phenetic groups; however, at the same level of similarity, the dendrogram generated by AFLP markers revealed five major phenetic groups. Although higher resolution was obtained with AFLP markers, probably due to the higher number of loci analyzed, considerable similarity between the groupings generated by the RAPD and AFLP markers was observed. The attribution test corroborated the grouping analysis, since the isolates of *B. bassiana* were attributed to 2 genotype clusters when the RAPD data were taken into account, and 3 genotype

clusters for analysis using AFLP. Additional data obtained from the attribution test relates to the participation of each isolate in a given *cluster*. A great many of the isolates exhibited Q-values close to 100%, ie. participated in only one *cluster*. A few of the isolates exhibited low participation (Q lower than 44 %) in a second or third *cluster*. This may suggest low genetic flow across populations.

According to Rehner and Buckley (2005), the nucleotide sequences in the ITS region allow six clades (A to F) to be identified in the *Beauveria* genus. Interestingly, the isolates of *B. bassiana* occupy two clades (A and C). The phylogenetic distance between these two clades of the same species, *B. bassiana*, is greater than that between each clade and the clade represented by the species *B. brongniartii*.

According to the authors, the convergent morphology of the conidia produced by members of clades A and C exhibits some taxonomic confusion as to the morphological characters and does not show the real diversity of the species within these groups. They therefore suggest that specialists in the genus *Beauveria* select a neotype from clade A or C for describing a second species. In the authors' opinion, clade A should keep the name *B. bassiana*, since the various strains studied for biological control and the various strains commercially registered for use in biolcontrol are phylogenetically disposed in clade A. The alignment of the sequences in the ITS region, obtained in this study with the sequences deposited in the NCBI database (32), show that all these Brazilian isolates fall within the same clade, ie. clade A of *B. bassiana*.

Molecular variance (AMOVA) results obtained for both molecular markers indicate that the genetic diversity of the isolates of *B. bassiana* is not distributed among the different hosts of *B. bassiana*, nor among the different locations from which the isolates originated, since the structuring of the *B. bassiana* population cannot be derived from these data. According to Bidochka et al. (6), there is a paradigm in the pathology that assumes that the entomopathogenic fungi genotype is associated with a given host insect taxon which the fungus infects, and thus, there is a tendency to concentrate attention on the interaction between the pathogen and its host, without fully evaluating the role of environmental factors. This is evidenced by the fact that the pathogenic phase of the fungus has been the focal point of many studies. Thus, many studies have been carried out proposing an association between *B. bassiana* and the host (5, 18, 10, 25, 38). Despite this, some

limited evidence has been produced to suggest that the genetic groups of *B. bassiana* have been coevolving with the host (19). Other work using the same techniques, but with different sets of isolates, has not found a significant statistical correlation between genotype and host (9, 25, 38.). The general conclusion of the most recent studies is that *B. bassiana* is a non-specialist entomopathogen with no particular phylogenetic association in regard to the specificity of the host (27, 32, 40). Morphological characteristics are insufficient to differentiate the various isolates of *B. bassiana*, which rules out the exclusive use of this type of character for in-the-field monitoring of these biological control agents. Multi-locus molecular markers, on the other hand, are incontestably better at differentiating the fungal isolates and could consequently be used to develop specific PCR markers for a given isolate. In the present work, the primer pair denoted 1024₈₃₈ was shown to be specific and efficient at detecting the *B. bassiana* CG 1024 isolate, that has been shown to be highly virulent to *C. sordidus*. The method described in this study is a simple and quick procedure for identifying the specific isolate and monitoring it in the field. As far we know, this is the first paper that describes an isolate-specific molecular marker for monitoring a *B. bassiana* isolate in the field.

Acknowledgments

This work was supported by grants and fellowships from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES). We thank Ricardo Vieira Cesar for reading the manuscript.

References

1. Akello, J.; Dubois, T.; Coyne, D.; Kyamanywa, S. (2008). Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and their damage in tissue-cultured banana plants. *Appl. Entomol. Experie.* 129, 157–165.
2. Akello, J.; Dubois, T.; Gold, C.S.; Coyne, D.; Nakavuma, J.; Paparu, P. (2007). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.), *J. Invertebr. Pathol.* 96, 34–42.

3. Almeida, J.E.M.; Machado, L.A. (2006). Fungos entomopatogênicos. Boletim Técnico: Controle Biológico de Insetos e Ácaros, Instituto Biológico, São Paulo, 15, 13-27.
4. Batista, F.A.; Leite, L.G.; Raga, A.; Sato, M.E. (1995). Enhanced activity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. associated with mineral oil against *Cosmopolites sordidus* (Germar) adults. An. Soc. Ent. Brasil. 24 (2), 405-408.
5. Berretta, M.F.; Lecuona, R.E.; Zandomeni, R.O.; Grau, O. (1998). Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. J. Invertebr. Pathol. 71, 145-150.
6. Bidochka, M.J.; Menzies, F.V.; Kamp, A.M. (2002). Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. Arch. Microbiol. 178, 531-537.
7. Castrillo, L.A. & W.M. Brooks. (1998). Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. J. Invertebr. Pathol. 72, 190-196.
8. Castrillo, L.A.; Vandenberg, J.D.; Wraight, S.P. (2003). Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. J. Invertebr. Pathol. 82, 75-83.
9. Coates, B.S.; Hellmich, R.L.; Lewis, L.C. (2002). *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. Mycol. Res. 106, 40-50.
10. Couteaudier, Y.; Viaud, M. (1997). New insights into population structure of *Beauveria bassiana* with regard to vegetative compatibility groups and telomeric restriction fragment length polymorphisms. FEMS Microbiol. Ecol. 22, 175-182.
11. Creste, S.; Tulmann Neto, A.; Figueira, A. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant. Mol. Biol. Rep. 19, 299-306.
12. Devi, K.; Reineke, A.; Rao, M.; Rao, N.; Reddy, N.; Padmavathi, J. (2006). Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Genome. 49, 495-504.
13. Devi, K.U.; Padmavathi, J.; Sharma, H.C.; Seetharama, N. (2001). Laboratory evaluation of the virulence of *Beauveria bassiana* isolates to the sorghum shoot borer *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) and their characterization by RAPD-PCR. World J. Microbiol. and Biotechnol. 17, 131-137.
14. Dolci, P.; Guglielmo, F.; Secchi, F.; Ozino, O.I. (2006). Persistence and efficacy of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against *Melolontha melolontha* in the Valley of Aosta (Northwest Italy). J. Appl. Microbiol. 100, 1063-1072.

15. Evano, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. (2005). Detecting the number of *clusters* of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.
16. Fernandes, K.K.; Moraes, A .M.L.; Pacheco, R.S.; Rangel, D.E.N.; Miller, M.P.; Bittencourt, V.R.E.P.; Roberts, D.W. (2009). Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. *J. Appl. Microbiol.* 107, 760-774.
17. Fungaro, M. H. P.; Vieira, M. L. C.; Pizzirani-Kleiner, A. A.; Azevedo, J. L. (1996). Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. *Let. Appl. Microbiol.* 22, 389 – 392.
18. Gaitan, A.; Valderrama, A.M.; Saldarriaga, G.; Velez, P.; Bustillo, A. (2002). Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. *Mycol. Res.* 106, 1307-1314.
19. Glare, T.R. (2004). Molecular characterisation in the entomopathogenic fungal genus *Beauveria*. *Laimburg J.* 1, 286-298
20. Glare, T.R.; Inwood, A.J. (1998). Morphological and genetic characterisation of *Beauveria spp.* from New Zealand. *Mycol. Res.* 102, 250-256.
21. Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp.* 41, 95-98.
22. Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci.Nat.* 44, 223– 270.
23. Jordão, A.L.; Batista Filho, A.; Leite, L.G.; Beriam, L.O.S.; Almeida, J.E.M. (1999). Caracterização e Eficiência de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Controle de *Cosmopolites sordidus*. *Arq. Inst. Biol.* 66, 107-111.
24. Lopes, R.; Lopes, M.T.G.; Carneiro, M.S.; Matta, F.P.; Camargo, L.E.A.; Vieira, M.L.C. (2006). Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae* in yellow passion fruit. *Genome.* 49, 17-29.
25. Maurer, P.; Couteaudier, Y.; Girard, P.A.; Bridge, P.D.; Riba, G. (1997). Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.* 101, 159-164.
26. Mesquita, A. L. M. (2003). Importância e Métodos de Controle do Moleque ou Broca-do-Rizoma-da-Bananeira. *Circ. Téc., Embrapa.*
27. Meyling, N.V.; Lübeck, M.; Buckley, E.P.; Eilenberg, J.; Rehner, S.A. (2009). Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Mol. Ecol.* 18, 1282-1293.
28. Michereff Filho, M.; Faria, M. R.; Wraight, S.P. (2009). Micoinseticidas e Micoacaricidas no Brasil: Como estamos após três décadas? *Arq. Inst. Biol.*

29. Muro, M.A; Elliott, S.; Moore, D.; Parker, L.B.; Skinner, M.; Reid, W.; Bouhssini, M. (2005). Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). *Mycol. Res.* 109, 294-306.
30. Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M. ;Macdonald K.D.; Bufton, A.W.J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*, *Adv. Gen.* 5, 141–238.
31. Pritchard, J.K; Stephens, M.; Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Gen.* 155, 945–959.
32. Rehner, A.S.; Buckley, E. A (2005). *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycol.* 97, 84-98.
33. Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Owner's manual.
34. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467.
35. Santoro, P. H.; Neves, P. M. O. J.; Cavaguchi, S. A.; Constanski, K.; Amaro, J. T.; Alves, L. F. A.; Gomes, B. B. (2008). Controle associado de *Alphitobius diaperinus* e efeito de microrganismos eficazes no desenvolvimento de *Beauveria bassiana*. *Pesq Agrop Bras.* 43, (1), 1-8,
36. Schneider, S.; Kueffer, J.M.; Roessli, D.; Excoffier, L. (2000). ARLEQUIN version 2.0. A software for population genetic data analysis. Genetic and Biometry Lab, University of Geneva, Switzerland.
37. Thompson, J. D., Higgins D. G, And T. J. Gibson. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position- specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673–4680.
38. Urtz, B.E.; Rice, W.C. (1997). RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Let. Appl. Microbiol.* 25, 405–409.
39. Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Vandelee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23 (21), 4407-4414.
40. Wang, C.; Shah, F.A; Patel, N.; Li, Z.Z.; Butt, T.M. (2003). Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. *Envir. Microbiol.* 10, 908–915.
41. White, T. J.; Burns, T.; Lee, S.; Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Edited by INNIS, M. A.; GELFAND; D. H., SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. Academic Press, San Diego,

315 – 322.

42. Yap, I.; Nelson, R.J. (1996). Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrogrammes. IRRI Discussion Paper Series n. 14. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Legends

Código	Local de origem	Hospedeiro
CG 11	Londrina – PR	<i>Stemochus subsignatus</i>
CG 138	Recife – PE	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 458	Londrina – PR	<i>Anthonomus grandis</i>
CG 475	Londrina – PR	<i>Stemochus subsignatus</i>
CG 478	Campinas – SP	<i>Anthonomus grandis</i>
CG 545	Aracaju – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 547	Estância – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 556	Santa Luzia – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 557	Ilha das Flores – SE	<i>Homalinotus cortaceus</i>
CG 864	Saquarema – RJ	<i>Homalinotus cortaceus</i>
CG 865	Malhador – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 876	Município de Wagner – BA	<i>Metamasius hemipterus</i>
CG 877	Juazeiro do Norte – CE	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 881	Fadinal – RS	<i>Ochetina</i> sp.
CG 890	Itajai – SC	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 919	S. José do Rio Preto – SP	<i>Hypothenemus hampei</i>
CG 928	Aracaju – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 929	Aracaju – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 930	Aracaju – SE	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
CG 1008	Piracicaba – SP	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1012	Brasília – DF	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1013	Brasília – DF	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1014	Brasília – DF	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 02	Desconhecida	Desconhecida
CG 1021	Goiânia – GO	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1024	Cruz das Almas – BA	<i>Metamasius hemipterus</i>
CG 1028	Cruz das Almas – BA	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1029	Vicência – PE	<i>Cosmopolites sordidus</i>
CG 1035	Desconhecida	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 17	Cosmópolis – SP	<i>Anthonomus grandis</i>
IBCB 39	BA	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 47	Cascavel – PR	<i>Anthonomus grandis</i>
IBCB 82	Goiânia – GO	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 84	Cascavel – PR	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 97	Cascavel – PR	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 98	Lavras – MG	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 135	Desconhecida	Desconhecida
UEL 08	Assai – PR	<i>Hypothenemus hampei</i>
UNI 39	S.M. Iguapu – PR	<i>Cosmopolites sordidus</i>
UNI 40	Cascavel – PR	<i>Cosmopolites sordidus</i>
UEL 177	Desconhecida	Desconhecida
UEL 50	Desconhecida	Desconhecida

Table 1 – Isolates of the *Beauveria bassiana* analysed in this study

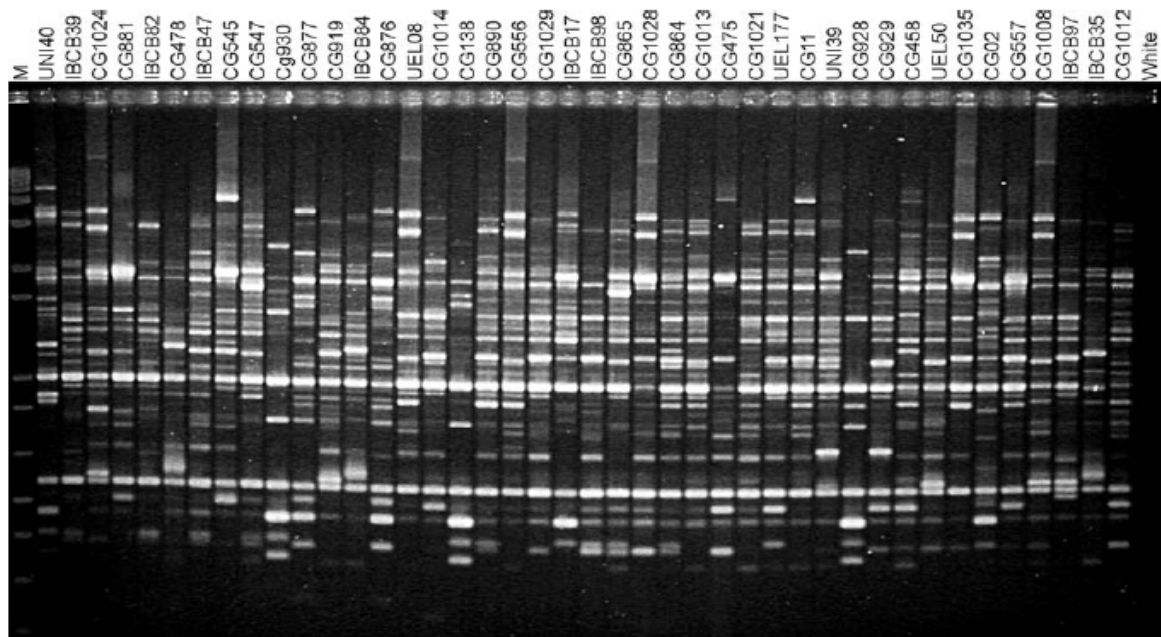


Figure 1 – Agarose gel showing the fingerprint generated by *Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)* using *OPE 14 primer*; Lane M, molecular weight marker 1 kb plus – DNA Ladder.

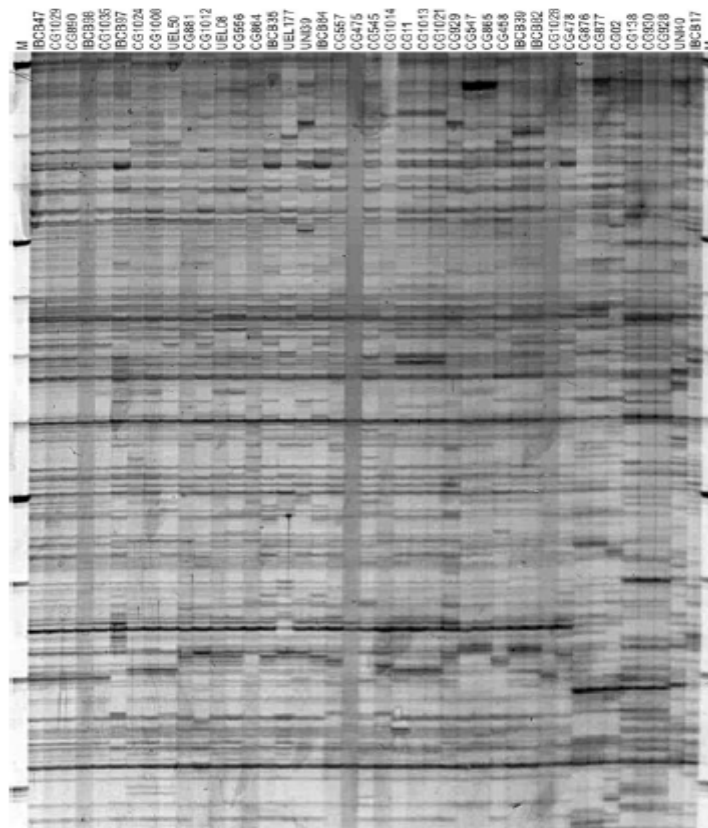


Figure 2 – Polyacrylamide gel showing the fingerprint generated by *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)* using a combination of *primers E+CG/M+AG*; Lane M, mixture of 100 bp and 25 bp molecular weight markers (Invitrogen®).

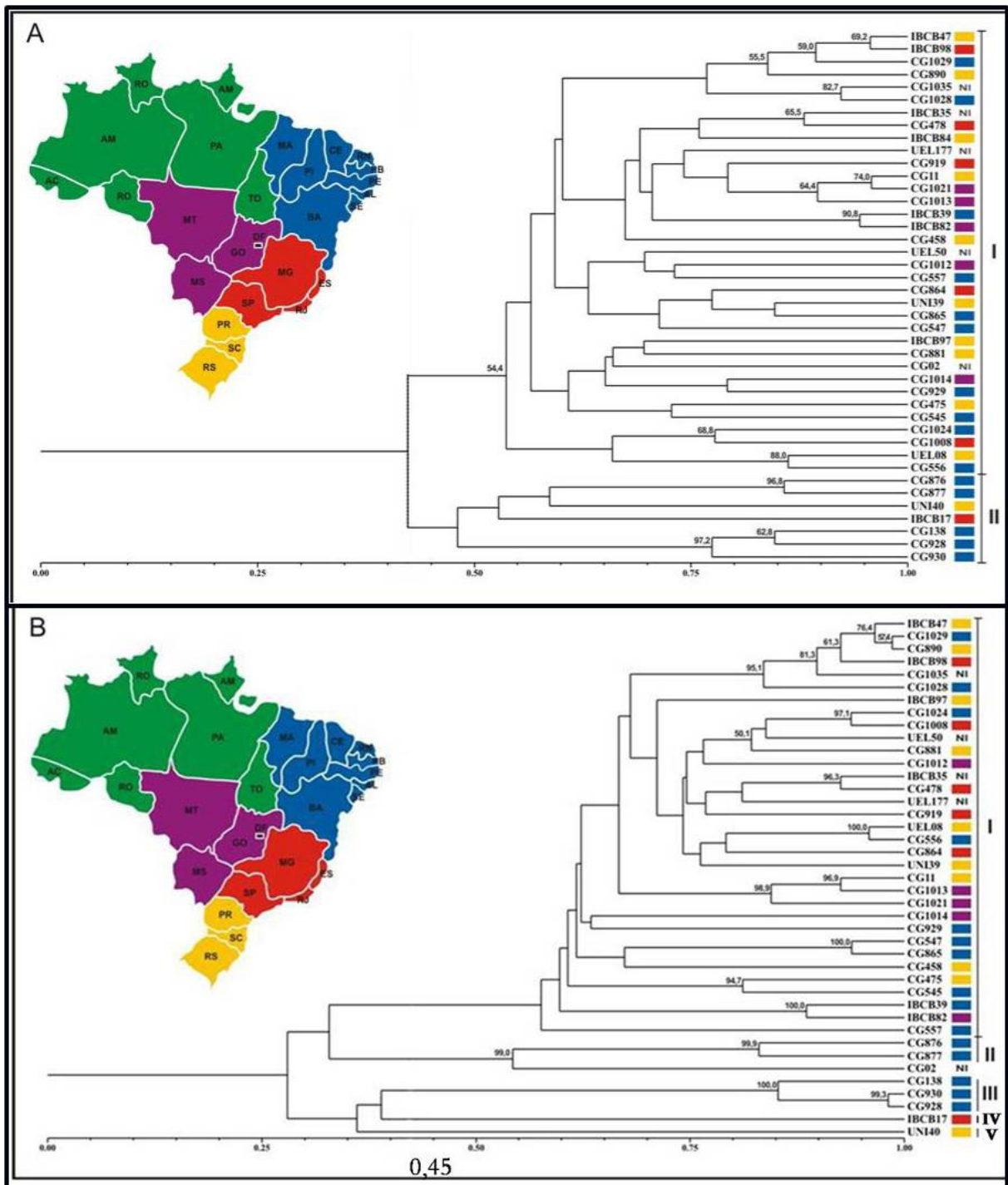


Figure 3 – Dendrograms generated from data on genetic similarity among isolates of *B. bassiana*, grouped according the UPGMA method, using loci obtained by RAPD (A) and AFLP (B). The regions of each isolate are represented by colors corresponding to the map. Bootstrap values higher than 50%, obtained from 1000 resamplings, are indicated at the nodes.

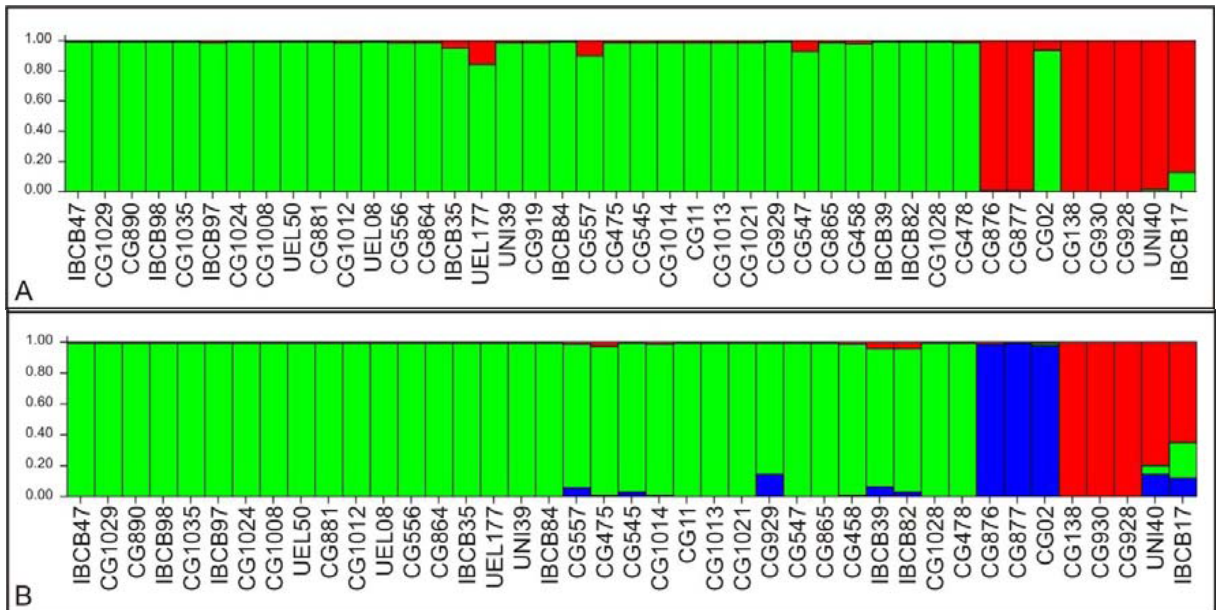


Figure 4 – Graphic resulting from attribution tests carried out using *software Structure 2.2*, based on data generated by RAPD (A) and AFLP (B). Each vertical bar represents an isolate and each color represents a *cluster*. The Y-coordinate shows the participation coefficient (Q) of an isolate in the *cluster*.

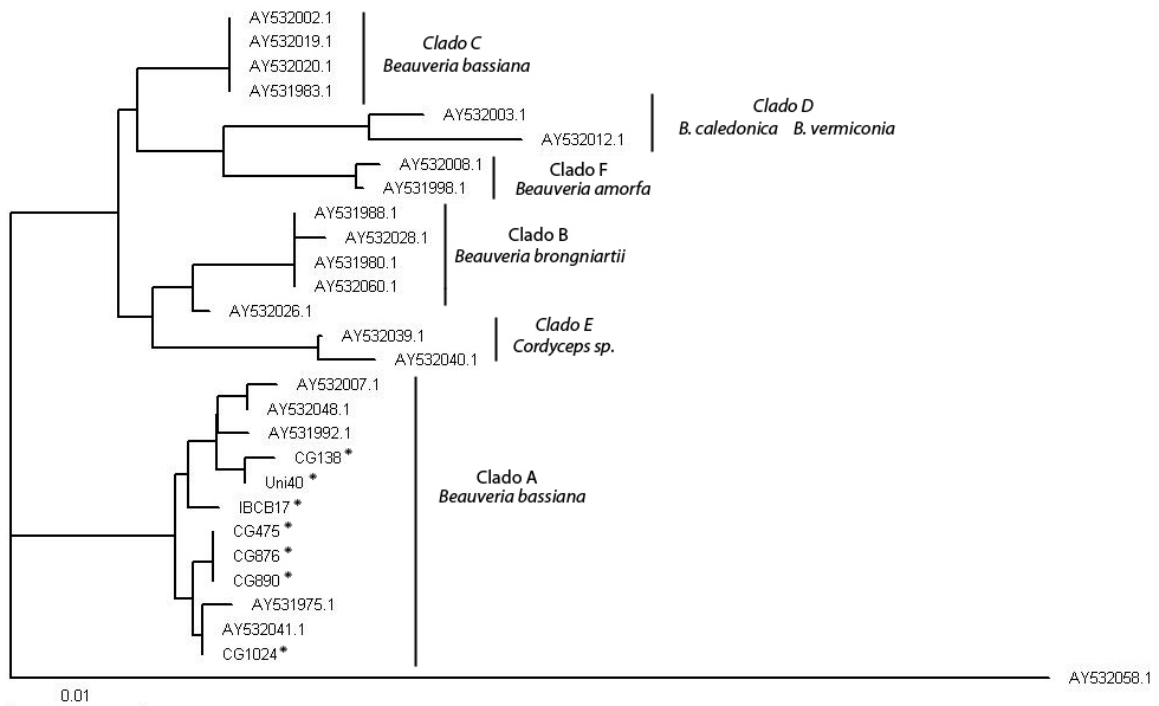


Figure 5 – Alignment generated by the CLUSTALW program and shaded using BOXSHADE. Identical nucleotides are marked by black boxes and distinct nucleotides are not shaded.

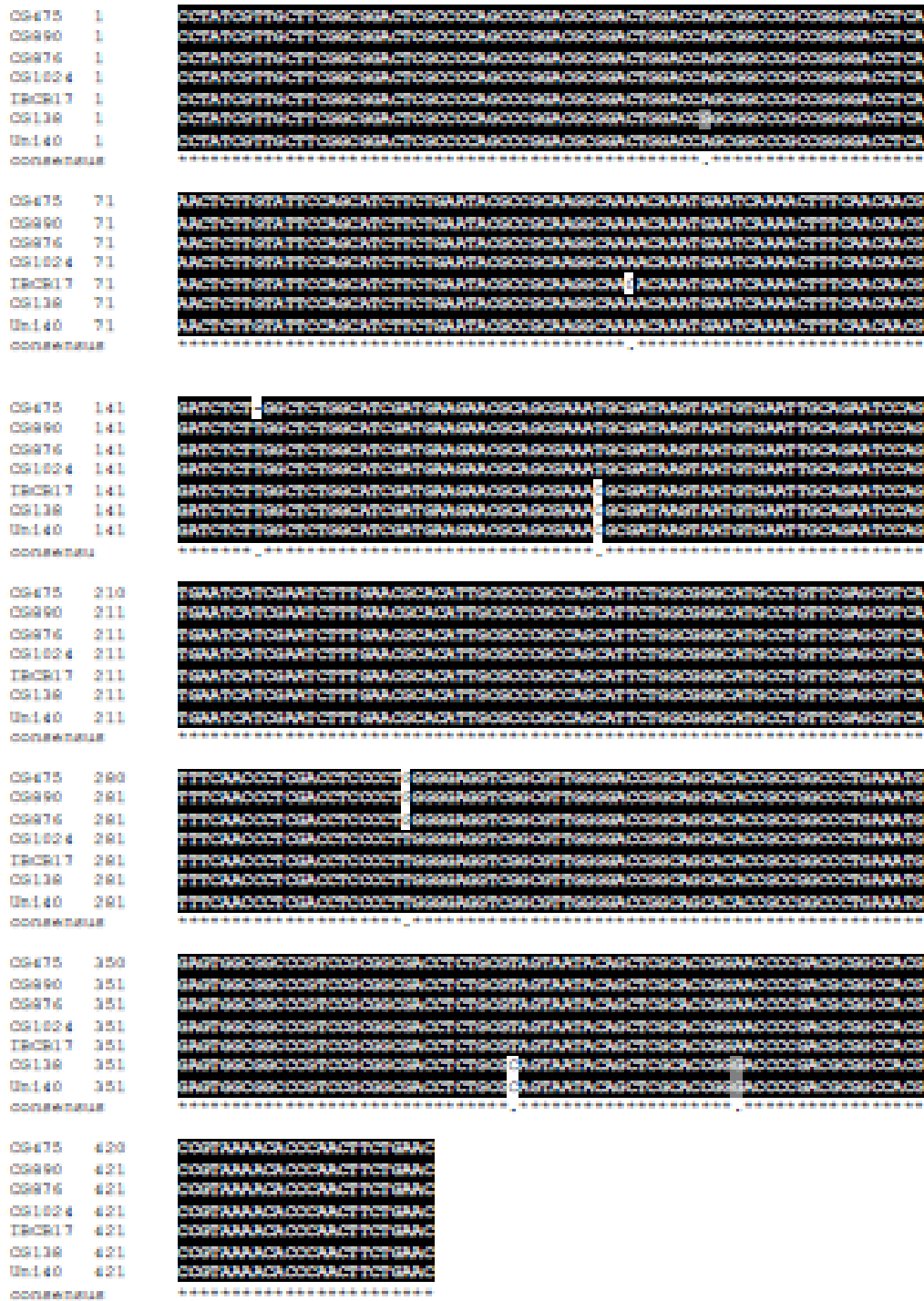


Figure 6 – Phylogenetic tree generated from sequences in the ITS1 – 5,8S – ITS2 region of isolates of *B. bassiana* using the CLUSTAL-W program and the neighborjoining method. The sequences obtained in this study are from the isolates marked with an asterisk. The other sequences were obtained from the NCBI database and are identified by accession number.

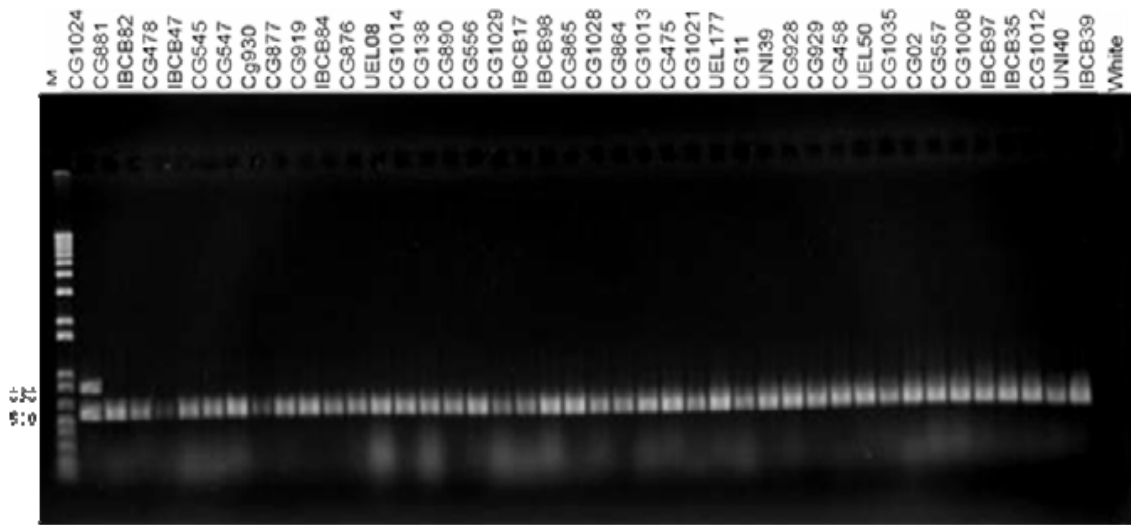


Figure 7 – Detection based on a specific PCR using the 1024F₈₃₈ and 1024R₈₃₈ primers of *B. bassiana* isolate CG 1024, corresponding to the 838-bp fragment indicated. Lane M, 1 kb Plus DNA Ladder molecular weight marker. 580-bp fragment corresponding to amplification of the ITS1-5,8S-ITS2 region, used as a positive control for all isolates.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1) Ao nível de 45% de similaridade os marcadores de RAPD revelaram dois grupos de isolados, enquanto os marcadores de AFLP revelaram, neste mesmo nível de similaridade, a formação de 5 grupos;

2) O teste de atribuição corroborou com a análise de agrupamento, mostrando que os isolados de *B. bassiana* foram atribuídos a 2 *clusters* genotípicos quando considerados os dados de RAPD, e 3 *clusters* genotípicos quando analisados por AFLP. Ficou demonstrada também a participação dos isolados em apenas um dos *clusters* obtidos. Em poucos isolados foi observada uma pequena participação (Q menor que 44 %) em um segundo ou terceiro *cluster*, sugerindo pouco fluxo gênico entre as populações;

3) A análise de sequências de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal permitiu identificar os isolados fúngicos como pertencente ao Clado A de *Beauveria bassiana*;

4) Através de marcadores de RAPD, foi possível isolar um fragmento característico do isolado CG 1024, e a partir deste desenvolver um marcador isolado-específico para detecção e monitoramento deste isolado, que apresenta alta virulência a *C. Sordidus*, em campo.

REFERÊNCIAS

- AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C.S. et al. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.), **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 34–42, 2007.
- AKELLO, J.; DUBOIS, T.; COYNE, D. et al. Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and their damage in tissue-cultured banana plants. **Applied Entomology Experience**, v. 129, p.157–165, 2008
- ALMEIDA, J.E.M.; MACHADO, L.A. Fungos entomopatogênicos. Boletim Técnico: Controle Biológico de Insetos e Ácaros, Instituto Biológico, São Paulo, v. 15, p. 13-27, 2006.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B., **Controle Microbiano de Insetos**, FEALQ, São Paulo, Brasil, p. 289-381, 1998.
- AINSWORTH, G.C. Agostino Bassi, 1773–1856. **Nature**, v.177, p. 255–257, 1973.
- ARLEU, R.J.; NETO, S. Broca da bananeira *Cosmopolites sordidus* (Germ., 1824) Coleoptera: *Curculionidae*. v.34, p.359- 367, 1984.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403 – 410, 1990.
- AZEVEDO, A.C.S.; FURLANETO, M.C.; SOZA-GOMES, D.R. et al. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agrícola**, v.57, p729-732, 2000.
- BATISTA, F.A.; SATO, M.E.; LEITE, L.G. et al. Utilização de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no controle do moleque da bananeira *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.13, n.4, p.35-40, 1991.
- BATISTA, F.A.; LEITE, L.G.; RAGA, A. et al. Enhanced activity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. associated with mineral oil against *Cosmopolites sordidus* 83 (Germar) adults. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, n.2, p.405-408, 1995a.
- BATISTA, F.A.; LEITE, L.G.; RAGA, A. et al. Utilização de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no manejo de *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824, em Miracatu, SP. O Biológico, São Paulo, v.57, n.1/2, p.17-19, 1995b.
- BERRETTA, M.F.; LECUONA, R.E.; ZANDOMENI, R.O. et al. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.145-150, 1998.
- BORGES, A.L. Aspectos gerais da produção orgânica de frutas. Alimentos orgânicos: produção, tecnologia e certificação, p. 235-288, 2003.

BIDOCHKA, M.J.; MC DONALD, M.A.; ST. LEGER, R.J. et al. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, v.25, p.107–113, 1994

BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M. et al. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1335–1342, 2001.

BIDOCHKA, M.J.; MENZIES, F.V.; KAMP, A.M. Genetic groups of the insectpathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. **Archives of Microbiology**, v.178, p. 531-537, 2002

BUTT, T.M.; WALDEN, S. Fungal biological control agents. **Pesticide Outlook**, v.11, p.186-191, 2000.

CARBALLO, M.V. Mortalidad de *Cosmopolites sordidus* com diferentes formulaciones de *Beauveria bassiana*. **Manejo Integrado de Plagas**, v.48, p.45-48, 1998.

CARNEIRO, A.; GOMES, E.; GUIMARÃES, C. et al. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.513-520, 2008

CASTRILLO, L.A.; VANDENBERG, J.D.; WRIGHT, S.P. Strainspecific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence84 characterized amplified region markers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.75-83, 2003.

CHASE, A.R.; OSBORNE, L.S.; FERGUSON, V.M. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. **Florida Entomologist**, v. 69, p. 285-292, 1986.

COATES, B.S.; HELLMICH, R.L.; LEWIS, L.C. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. **Mycological Research**, v.106, p.40- 50, 2002.

COUTEAUDIER, Y.; VIAUD, M. New insights into population structure of *Beauveria bassiana* with regard to vegetative compatibility groups and telomeric restriction fragment length polymorphisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v.22, p.175–182,1997.

CRAVANZOLA, F.; PIATII, P.; BRIDGE, P.D. et al. Detection of genetic polymorphism by RAPD–PCR in strains of the entomopathogeic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha* spp.). **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 289–294, 1997.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

- CRUZ, L.P.; GAITAN, A.L.; GONGORA, C.E. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.71, p.918-926, 2005.
- DALZOTO, P.R. Parameiose e caracterização de RNAs dupla fita no deuteromiceto *Beauveria bassiana* (VUILL.). **Dissertação em Genética**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2004.
- DEVI, K.U.; PADMAVATHI, J.; SHARMA, H.C. et al. Laboratory evaluation of the virulence of *Beauveria bassiana* isolates to the sorghum shoot borer *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: *Pyralidae*) and their characterization by RAPDPCR. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.131-137, 2001.
- DEVI, K.; REINEKE, A.; RAO, M. et al. Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Genome**, v. 49, p. 495-504, 2006.
- DOLCI, P.; GUGLIELMO, F.; SECCHI, F. et al. Persistence and efficacy of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against *Melolontha melolontha* in the Valley of Aosta (Northwest Italy). **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.1063-1072, 2006.
- EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of *clusters* of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 2611–2620, 2005.
- FANCELLI, M.; NASCIMENTO, A.; SILVA, S. et al. Controle Biológico de *Cosmopolites sordidus* (Germ.) (Coleoptera: *Curculionidae*) pelo Fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Comunicado Técnico**, Embrapa, 2004.
- 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, p. 237-256, 2007
- FENG, Z.; CARRUTHERS, R.I.; LARKIN, T.S. A phenology model and field evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) mycosis of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hbn.) (Lepidoptera: *Pyralidae*). **Canadian Entomologist**, v.120, p. 133–144, 1988.
- FERNANDES, K.K.; MORAES, A.M.L.; PACHECO, R.S. et al. Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 760-774, 2009
- FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.17, p. 12-16, 2000.
- GAITAN, A.; VALDERRAMA, A.M.; SALDARRIAGA, G. et al. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. **Mycological Research**, v.106, p.1307-1314, 2002.

GLARE, T.R. Molecular characterisation in the entomopathogenic fungal genus *Beauveria*. **Laimburg Journal**, v. 1, p.286-298, 2004.

GLARE, T.R.; INWOOD, A.J. Morphological and genetic characterisation of *Beauveria spp.* from New Zealand. **Mycological Research**, v.102, p.250-256, 1998.
HOOG, G.S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**, v.1, p.1-41, 1972.

HOOG, G.S. Notes on some hyphomycetes and their relatives. *Persoonia* v.10, p.33-81, 1978.

HUMBER, R. A. Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates. **New York: ARSEF**, p. 1- 5, 2007.

HUMBER, R.A. Collection of entomopathogenic fungal cultures: catalog of strains. **US Department of Agriculture, Agricultural Research Service**. Disponível em: <www.ppru.cornell.edu/mycology/Insectmycology.htm> Acesso em: 20 out 2009.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M. et al. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential*. **CABI Publishing**, p. 23-69, 2001.

JORDÃO, A.L.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; BERIAM, L.O.S.; ALMEIDA, J.E.M. Caracterização e Eficiência de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Controle de *Cosmopolites sordidus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.66, p.107-111, 1999.

JOSHI. L.; St. LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, p. 211-217, 1994.

KOUVELIS. V.N.; GHIKAS, D.V.; EDGINGTON, S. et al. Molecular characterization of isolates of *Beauveria bassiana* obtained from overwintering and summer populations of Sunn Pest (*Eurygaster integriceps*), **Letters in Applied Microbiology**, v.46, p. 414-420, 2008.

LARA, F.M.; SARGO, H.L.B.; CAMPOS, A.R. et al. Preferência de *Cosmopolites sordidus* Germ. (Coleoptera: Curculionidae) por Genótipos de Bananeira, em Condições de Laboratório. **Ecossistema**, v.25, p.35-38, 2000.

LEMA LÓPEZ Controle biológico de *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Dryophthoridae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e flutuação populacional em Ibiporã, Paraná, Brasil. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; CARNEIRO, M.S. et al. Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae* in yellow passion fruit. **Genome**, Ottawa, v. 49, p. 17-29, 2006.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O. et al. Marcadores moleculares dominantes (Rapl e Aflp). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 56-60, 2002.

MACLEOD, D.M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. **Canadian Journal of Botany**, v.32, p.818–890, 1954.

MAURER, P.; COUTEAUDIER, Y.; GIRARD, P.A. et al. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. **Mycological Research**, v.101, p.159-164, 1997

MESQUITA, A. L. M. Importância e Métodos de Controle do Moleque ou Broca-do-Rizoma-da-Bananeira. **Circular técnica**, Embrapa, 2003

MEYLING, N.V.; LÜBECK, M.; BUCKLEY, E.P. et al. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. **Molecular Ecology**, v.18, p 1282-1293, 2009

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M. R.; WRAIGHT, S.P. Micoínseticidas e Micoacaricidas no Brasil: Como estamos após três décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, 2009.

MUGNAI, L.; BRIDGE, P.D.; EVANS, H.C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. **Mycological Research**, v.92, p.199-209, 1989.

MURAD, A.; LAUMANN, R. A.; MEHTA, A. et al. Screening and secretomic analysis of entomopathogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** v.145, p. 333-338, 2007

MURO, M.A.; MEHTA, S.; MOORE, D. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, p 249-257, 2003.

MURO, M.A; ELLIOTT, S.; MOORE, D. et al. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). **Mycological Research**, v.109, p. 294-306, 2005.

NANKINGA, C.M.; MOORE, D. Reduction of banana weevil populations using different formulations of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v.10, p.645-657, 2000.

NEUVÉGLISE, C.; BRYGOO, Y.; RIBA, G. 28S rDNA group I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. **Molecular Ecology**, v.6, p. 373–381, 1997.

PIATTI, P.; CRAVANZOLA, F.; BRIDGE, P.D. et al. Molecular characterization of *Beauveria brongniartii* isolates obtained from *Melolontha melolontha* in Valle d'Aosta (Italy) by RAPD–PCR. **Letters Applied in Microbiology**, v. 26, p. 317–324, 1998.

PIPE, N.D.; CHANDLER, D.; BAINBRIDGE, B.W. et al. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 99, p. 485–491, 1995.

- POPRAWSKI, T.J.; RIBA, G.; JONES, W.A. et al. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from Sitona weevils (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v.17, p. 275–279, 1988.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*, **Advances in Genetics** v.5, p. 141–238, 1953.
- PRITCHARD, J.K; STEPHENS, M.; DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p. 945–959, 2000.
- REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; SOUZA, E.J. et al. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae). **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 544-547, 2001.
- REHNER, A.S.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alfa sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v.97, p.84-98, 2005.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Owner's manual.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J.M.; ROESSLI, D. et al. ARLEQUIN version 2.0. A software for population genetic data analysis. **Genetic and Biometry Laboratory**, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- ST. LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J. Insect–fungal interactions. In: K. Soderhall, G. Vasta and S. Iwanaga, Editors, **New Directions in Invertebrate Immunology** , p. 441–478, 1996.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F. et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, p. 4876-4882, 1997.
- THOMPSON, S.R.; BRANDENBURG R.L.; ARENDS J.J. Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. **Biological Control**, v. 39, p. 401–407, 2006
- URTZ, B.E.; RICE, W.C. RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*, **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 405–409, 1997.
- VIAUD, M.; COUTEAUDIER, Y.; LEVIS, C. et al. Genome organization in *Beauveria bassiana*: eletrophoretic karyotype, gene mapping and telomeric fingerprints. **Fungal Genetics and Biology**, v.20, p.175–183. 1996.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

VUILLEMIN, P. *Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacies. **Paris Sociedad Botanica France Bull**, v. 59, p. 34-40, 1912.

WANG, C.; SHAH, F.A; PATEL, N. et al. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**, V 10, p. 908-915, 2003

WANG, S.; MIAO, X.; ZHAO, W. et al. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **Mycological Research**, v.109, p.1364-1372, 2005.

YAP, I.; NELSON, R.J. Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrogrammes. IRRRI Discussion Paper Series n. 14. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 1996.