

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**OCORRÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E PROSPECÇÃO DE FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL,  
BRASIL**

Dissertação de mestrado

**Matheus da Silva Camargo**

Porto Alegre, dezembro de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**OCORRÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E PROSPECÇÃO DE FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS EM SOLOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL,  
BRASIL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Matheus da Silva Camargo**

Orientador: Dr. Augusto Schrank

Porto Alegre, dezembro de 2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Camargo, Matheus da Silva  
OCORRÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E PROSPECÇÃO DE FUNGOS  
ENTOMOPATÔGENICOS EM SOLOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO  
SUL, BRASIL / Matheus da Silva Camargo. -- 2021.  
87 f.  
Orientador: Augusto Schrank.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado  
do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,  
2021.

1. Fungos Entomopatogênicos. 2. Controle Biológico.  
3. Diversidade de Fungos. 4. Beauveria. 5.  
Metarhizium. I. Schrank, Augusto, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio do Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

“Most times, a ghost is a wish”

- Steven Crain

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha família, pelo apoio incondicional, no mestrado, na graduação, na vida.

Ao meu grandioso orientador, amigo e colega, Professor Augusto Schrank, por tudo. Da dúvida sobre qual laboratório fazer o mestrado à redação desta dissertação, meu muito obrigado.

Às minhas orientadoras na graduação, Professora Juliana Severo Fagundes Pereira e Professora Marilene Henning Vainstein. Jamais esquecerei daqueles que abriram as portas da carreira científica e me permitiram estar aqui.

Ao meu companheiro de vida, Luciano Zancan, por estar do meu lado sempre, independente da situação, devo assumir que não tenho palavras suficientes.

Ao grupo UIGURIA, amigos que possibilitaram, possibilitam e possibilitarão a minha continuidade na pesquisa. Do apoio científico ao emocional, na alegria e na tristeza, com publicação ou sem. Nico, Fefo, Uri e Sol, sou grato por tudo.

Aos amigos do pagode, Adão, Ammes, Andre, Cabelo, Duda, Elis, Susan e Tibu, em ordem alfabética, para que não tenha briga. Agradeço pelos momentos de refúgio e paz (relativa).

As amigas que me ouviram reclamar de relacionamentos à futebol, Ane, Camila e Val. Admiro a paciência e insistência.

A Dra. Júlia Reuwsaat, amiga que alugo como revisora particular, um agradecimento gigantesco, do tamanho dos dois manuscritos que te fiz ler.

A secretária do PPGBCM/UFRGS, Silvinha, pelo suporte 24 h/dia, pela amizade e empatia.

Aos demais professores, colegas e amigos do grupo fungos e do CBiot.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	12
1.1 Controle biológico de pragas .....	12
1.1.1 O gênero <i>Metarhizium</i> .....	12
1.1.2 O gênero <i>Beauveria</i> .....	13
1.2 Aplicações biotecnológicas de fungos entomopatogênicos.....	15
1.3 Interação fungos entomopatogênicos-hospedeiros .....	16
1.4 Ocorrência de fungos entomopatogênicos .....	20
1.5 Isolamento, identificação e aplicação de fungos entomopatogênicos .....	22
1.6 Fatores ambientais associados à ocorrência e aplicação de entomopatogênicos..	23
1.7 Controle microbiológico de pragas e o setor agrícola .....	25
1.8 Características geográficas do Estado do Rio Grande do Sul.....	27
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral .....	30
2.2 Objetivos específicos .....	30
3 RESULTADOS .....	31
3.1 Manuscrito a ser submetido ao periódico <i>Fungal Ecology: Occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in soils of Rio Grande do Sul State, Brazil</i> .....	32
4 DISCUSSÃO GERAL .....	66
5 CONCLUSÕES.....	73
6 PERSPECTIVAS .....	74
7 BIBLIOGRAFIA.....	75
8 CURRICULUM VITAE RESUMIDO .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ABCBio – Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico

Bloc – Região nuclear intergênica *B locus*, do inglês *B locus nuclear intergenic region*

CMP – Controle microbiológico de pragas

CNA – Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil

CTAB – Brometo de cetrimônio, do inglês *cetrimonium bromide*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental

FEPs/EPF – Fungos entomopatogênicos / do inglês *Entomopathogenic fungi*

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

ITS – Região espaçadora transcrita interna, do inglês *internal transcribed spacer*

MCC – Meio Cove completo

OA – Meio Ágar aveia, do inglês *Oatmeal Agar*

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

pH – Potencial hidrogeniônico

PIB – Produto interno bruto

RS – Rio Grande do Sul

SIRGAS – Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas

TEF – Fator de alongamento de tradução, do inglês *translation elongation factor*

LT50 – Tempo letal médio (tempo necessário para ocasionar a mortalidade de 50% da população experimental)

UV – Ultravioleta



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes ciclos de vida de fungos dos gêneros <i>Metarhizium</i> e <i>Beauveria</i> no ambiente .....	16
Figura 2. Ciclo de infecção de <i>M. anisopliae</i> em hospedeiro artrópode.....	17
Figura 3. Adesão, penetração e dispersão na interação fungo-hospedeiro.....	19
Figura 4. Amplitude térmica média anual no território brasileiro.....	28
Figura 5. Radiação solar global na América do Sul (2018) .....	29

## RESUMO

O Estado do Rio Grande do Sul está localizado na região subtropical do sul do Brasil e possui características ambientais únicas. O estado possui clima de amplitude térmica e radiação ultravioleta com elevada variação, bem como uma diversidade de biomas. Os aspectos ambientais singulares do Rio Grande do Sul permitem a exploração de microrganismos com potencial biotecnológico, incluindo fungos entomopatogênicos. Este trabalho, portanto, visou isolar e caracterizar fungos entomopatogênicos do Rio Grande do Sul, com foco na prospecção de agentes de controle biológico de amplo-espectro de ação. Quatrocentos e oitenta e quatro isolados fúngicos foram obtidos a partir de 89 amostras de solo, dos quais 470 foram isolados por métodos empregando meio semi-seletivo e 14 por técnicas de *insect-bait*. Com base nas características morfológicas e análise de sequências de DNA, foram identificados 13 diferentes gêneros: *Beauveria*, *Blackwellomyces*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Metapochonia*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Purpureocillium*, *Tolypocladium* e *Verticillium*. A técnica de *insect-bait*, no entanto, revelou isolados pertencentes, exclusivamente, ao gênero *Metarhizium*. A análise da distribuição dos gêneros mais abundantes indicou que os isolados do gênero *Metarhizium* ocorreram em áreas mais frias ( $< 17,8$  °C), enquanto os isolados do gênero *Purpureocillium* foram majoritariamente isolados em regiões de temperaturas médias (17,8 - 19,8 °C) a quentes ( $> 19,8$  °C). Os isolados dos gêneros *Beauveria* e *Fusarium* não apresentaram tendência de distribuição. Isolados pertencentes ao gênero *Beauveria* e *Metarhizium* foram avaliados sob diferentes condições de temperatura (12, 22, 28 e 37 °C). Dois padrões de crescimento foram observados, padrão I: crescimento a 12 °C e equivalência entre 22 e 28 °C, e padrão II: crescimento a 37 °C. Notavelmente, os isolados do gênero *Beauveria* apresentaram apenas o padrão I, enquanto os do gênero *Metarhizium* apresentaram ambos. Bioensaios empregando larvas de *Tenebrio molitor* revelaram isolados com potencial aplicação em estratégias de controle biológico em diferentes temperaturas, sendo AS218 (*Metarhizium brunneum*) e AS272 (*Beauveria bassiana*) os mais promissores. Os resultados obtidos neste estudo elucidam e contribuem para o conhecimento da distribuição e diversidade de fungos entomopatogênicos em áreas subtropicais e de elevada variação climática, bem como exploram o potencial biotecnológico dos fungos derivados destes ambientes.

## ABSTRACT

The Rio Grande do Sul State is in the subtropical region of southern Brazil and has unique environmental characteristics. The state has a highly variable temperature range and ultraviolet radiation, as well as a diversity of biomes. The unique environmental aspects of Rio Grande do Sul allow the exploration of microorganisms with biotechnological potential, including entomopathogenic fungi. This work, therefore, aimed to isolate and characterize entomopathogenic fungi from the Rio Grande do Sul, focusing on the prospection of biological control agents with broad-spectrum action. Four hundred and eighty-four fungal isolates were obtained from 89 soil samples, of which 470 were isolated by methods using semi-selective medium and 14 by insect-bait techniques. Based on morphological characteristics and DNA sequence analysis, 13 different genera were identified: *Beauveria*, *Blackwellomyces*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Metapochonia*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Purpureocillium*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. The insect-bait technique, however, revealed isolates belonging exclusively to the genus *Metarhizium*. Distribution analysis of the most abundant genera indicated that *Metarhizium* isolates occurred in colder areas ( $< 17.8$  °C), whereas *Purpureocillium* isolates were mostly isolated in regions of medium ( $17.8 - 19.8$  °C) to warm ( $> 19.8$  °C) temperatures. Isolates of the genera *Beauveria* and *Fusarium* showed no distribution tendency. Isolates belonging to the genera *Beauveria* and *Metarhizium* were evaluated under different temperature conditions (12, 22, 28, and 37 °C). Two growth patterns were observed, the pattern I: growth at 12 °C and equivalence between 22 and 28 °C, and pattern II: growth at 37 °C. Notably, isolates of the *Beauveria* genus showed only pattern I, while isolates belonging to the *Metarhizium* genus showed both. Bioassays employing *Tenebrio molitor* larvae revealed isolates with potential application in biological control strategies at different temperatures, being AS218 (*Metarhizium brunneum*) and AS272 (*Beauveria bassiana*) the most promising. The results obtained in this study elucidate and contribute to the knowledge of the distribution and diversity of entomopathogenic fungi in subtropical areas with high climatic variation, as well as explore the biotechnological potential of fungi derived from these environments.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Controle biológico de pragas

O controle biológico é definido por Eilenberg e colaboradores (2001) como: “O uso de organismos vivos para suprimir a densidade populacional ou impacto causado de um organismo-pestes específico, tornando este menos abundante ou menos danoso do que poderia ser”. Dentre os organismos passíveis de aplicação como agentes de controle biológico, estão bactérias, fungos, vírus, ácaros, insetos, nematoides e alguns vertebrados (LACEY *et al.*, 2015).

Os fungos filamentosos foram os primeiros patógenos utilizados no controle de populações de artrópodes (DAVIDSON, 2012). Dentre eles, os gêneros *Isaria*, *Trichoderma*, *Metarhizium* e *Beauveria* são os mais aplicados no controle de ácaros e insetos, liderando a composição de produtos comerciais biologicamente ativos para estes fins (CHANDLER, 2017). Os fungos entomopatogênicos (FEPs) apresentam vasta distribuição geográfica, ocorrendo em regiões próximas à linha do equador (SANJUAN *et al.*, 2015), nos trópicos (SOSA-GÓMEZ; LÓPEZ LASTRA; HUMBER, 2010) e em regiões subárticas e subantárticas (MEYLING; SCHMIDT; EILENBERG, 2012; SEID *et al.*, 2019). Além disso, os FEPs ainda apresentam caráter de múltipla disponibilidade ambiental, podendo ser encontrados infectando um vasto número de hospedeiros, colonizando rizosferas e folhas, como endofíticos, ou mesmo atuando na decomposição de material orgânico no solo, como saprofiticos (IWANICKI *et al.*, 2019).

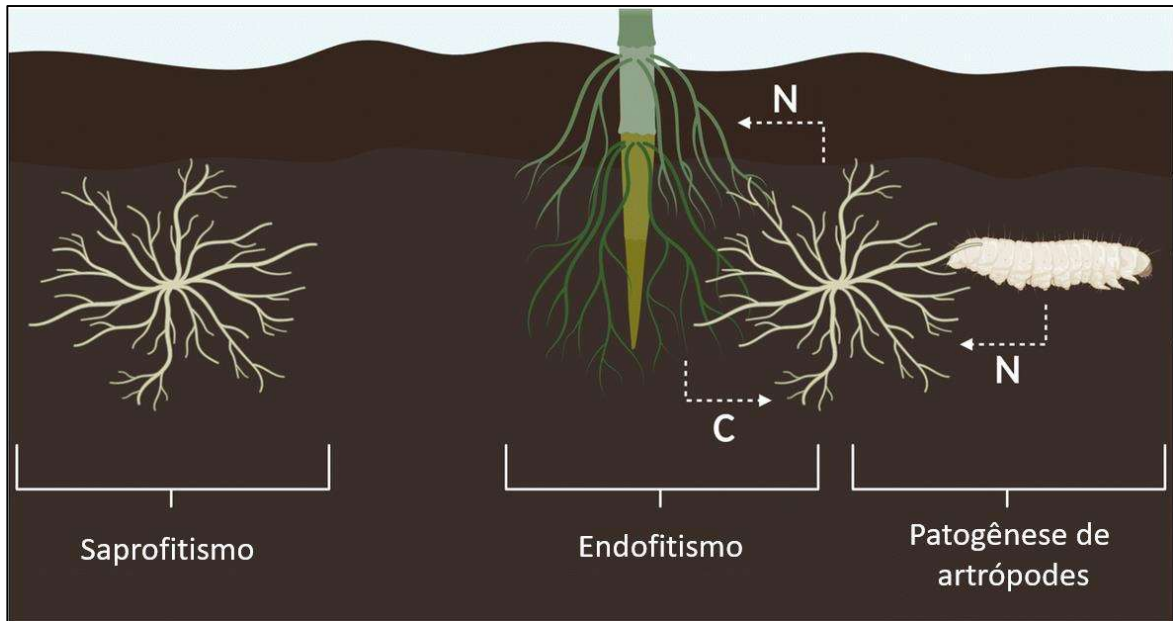
### 1.1.1 O gênero *Metarhizium*

O gênero *Metarhizium* pertence à ordem Hypocreales e a família Clavicipitaceae (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009). O gênero foi, inicialmente, definido com base nas características morfológicas microscópicas, tais como: conidióforos ramificados de forma variada, ocasionalmente simples em algumas espécies, Ápices de ramos portadores de uma a várias fiálides variáveis, de truncada para alongada, e; Conídios hialinos a castanhos ou verde, formando cadeias secas ou, então, hialinas a lilás, como na espécie *Metarhizium marquandii* (KEPLER, R. M. *et al.*, 2014). Dentre as diversas espécies compreendidas no gênero, *Metarhizium anisopliae* destaca-se como sendo uma das mais comumente isoladas, estudadas e amplamente aplicadas (IWANICKI *et al.*, 2019; TIAGO; OLIVEIRA; LIMA, 2014). *M. anisopliae* foi originalmente descrita por Metschnikoff (1879) como *Entomophthora anisopliae* e mais tarde transferido para o novo gênero *Metarhizium* por Sorokin em 1883 (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009; DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000). Essa espécie já foi isolada de mais de 200 espécies de artrópodes e compreende 33,9% dos pesticidas microbianos baseados em fungos entomopatogênicos (ZIMMERMANN, 2007b). Linhagens de *M. anisopliae* são eficazes contra uma ampla gama de artrópodes-praga pertencentes às ordens Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera e Diptera (ZIMMERMANN, 2007b).

### 1.1.2 O gênero *Beauveria*

*Beauveria* é um gênero fúngico entomopatogênico anamórfico e cosmopolita capaz de infectar uma ampla gama de artrópodes, incluindo aqueles de importância agrícola (ZIMMERMANN, 2007a). O gênero *Beauveria* pertence à ordem Hypocreales e a família Cordycipitaceae (REHNER *et al.*, 2011). A doença denominada “muscardina branca”, descrita inicialmente por Agostino Bassi, em 1835, foi observada em lagartas do bicho-da-

seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) e, posterior à descrição, deu-se início aos primeiros testes de infecção utilizando o fungo (REHNER *et al.*, 2011). A proposição taxonômica ocorreu em diferentes momentos, primeiro, por Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli em 1835, que nomeou como *Botrytis bassiana*, em homenagem a Bassi e, posteriormente, por Beauverie, em 1911, que realizou uma nova descrição taxonômica do grupo. Vuillemin, em 1912, formalizou o novo gênero *Beauveria* em homenagem a Beauverie, sendo *Beauveria bassiana* a espécie-tipo (LIMA, 1989; REHNER *et al.*, 2011). *B. bassiana* é um parasita facultativo, podendo tanto completar o ciclo de reprodução na forma de patógeno quanto na forma livre, como saprófito ou endofítico (Figura 1) (BOOMSMA *et al.*, 2014). O amplo espectro de hospedeiros evidencia o potencial de *B. bassiana* como um agente de controle de diversas pragas-alvo (ROHRLICH *et al.*, 2018). *B. bassiana* apresenta 707 espécies de hospedeiros insetos, os quais compreendem 521 gêneros e 149 famílias de 15 ordens. Além disso, 13 espécies hospedeiras da sub-classe Acarina, distribuídas em sete gêneros e seis famílias, também são suscetíveis a infecção por este fungo (ZIMMERMANN, 2007a). Em relação a pragas de cultivos, *B. bassiana* é usualmente relatada infectando insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera (ZIMMERMANN, 2007a). Filogeneticamente, *B. bassiana* forma um complexo de várias espécies crípticas que se posicionam dentro da família Cordycipitaceae (REHNER *et al.*, 2011). As características morfológicas do gênero, guiadas pela espécie-tipo *B. bassiana*, são definidas por hifas septadas, hialinas e de parede lisa, apresentando conídios aglomerados (cinco ou mais por grupo), com formato ovóide e base variando de subsférica a ampuliforme (REHNER *et al.*, 2011).



**Figura 1. Diferentes ciclos de vida de fungos dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* no ambiente.** Ambos os fungos podem persistir no ambiente como saprófitos, atuando na decomposição de matéria orgânica e se desenvolvendo no solo. Porém, neste mesmo ambiente, podem interagir de diferentes formas com insetos e plantas: como entomopatogênicos, rizosféricos e/ou endofíticos, respectivamente. Uma troca de três componentes ainda pode ser descrita: FEPs adquirem nitrogênio (N) a partir de insetos e, subsequentemente, transferem N para rizosferas a qual estão associados de forma endofítica. Em contrapartida, o fungo pode receber carbono fixado (C) na forma de fotossintatos (Adaptado de Stone and Bidochka, 2020).

### ***1.2 Aplicações biotecnológicas de fungos entomopatogênicos***

O potencial biotecnológico destes fungos tem sido explorado em diferentes esferas: (i) científica, na elucidação dos mecanismos de infecção do fungo e a ação sobre seus hospedeiros (SBARAINI *et al.*, 2016); (ii) agropecuária, na compreensão dos benefícios do uso e eficácia quando comparados aos defensivos químicos (HUSSAIN *et al.*, 2014; SINGH; RAINA; SINGH, 2017); (iii) econômica, na proposição de novas estratégias para a produção de controladores biológicos de baixo custo (ZHAO; LOVETT; FANG, 2016); e (iv)

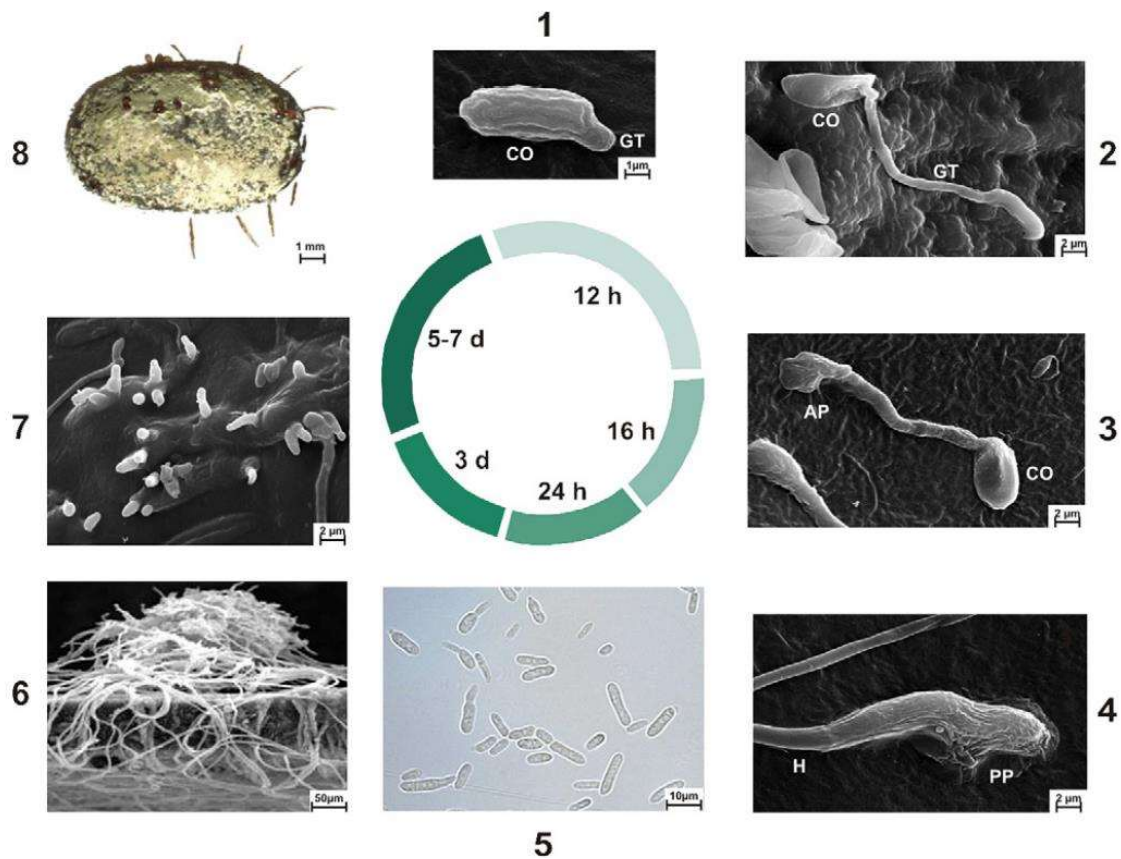
sanitário-ambiental, no desenvolvimento de técnicas ambientalmente corretas, auxiliando no controle de vetores de doenças emergentes, como populações de mosquitos transmissores de doenças (EVANS; ELLIOT; BARRETO, 2018; PAULA *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2021).

A utilização dos fungos entomopatogênicos é realizada, majoritariamente, pela aplicação direta de esporos no controle de artrópodes-praga, em um processo conhecido como controle microbiológico de pragas (CMP), onde é considerada a atividade do complexo fungo-hospedeiro (SANDHU *et al.*, 2012). Todavia, proteínas, metabólitos secundários e demais moléculas derivadas de FEPs têm ganhado destaque devido às suas propriedades inseticidas. Alguns estudos já mostraram o potencial de aplicação de FEPs modificados, principalmente em função da virulência, quando estes passam a expressar novas moléculas ou proteínas inseticidas (WANG, C.; ST LEGER, 2007).

### ***1.3 Interação fungos entomopatogênicos-hospedeiros***

Tomando como base o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, é possível descrever e compreender como FEPs podem ser aplicados para o controle de artrópodes-praga, de acordo com o processo de infecção (Figura 2). O entendimento das etapas de forma detalhada é crucial para a compreensão dos fatores envolvidos, bem como para a proposição de alterações capazes de propiciar maior interação entre as partes. Tais alterações visam aumentar a eficiência e, por consequência, a morte do hospedeiro.





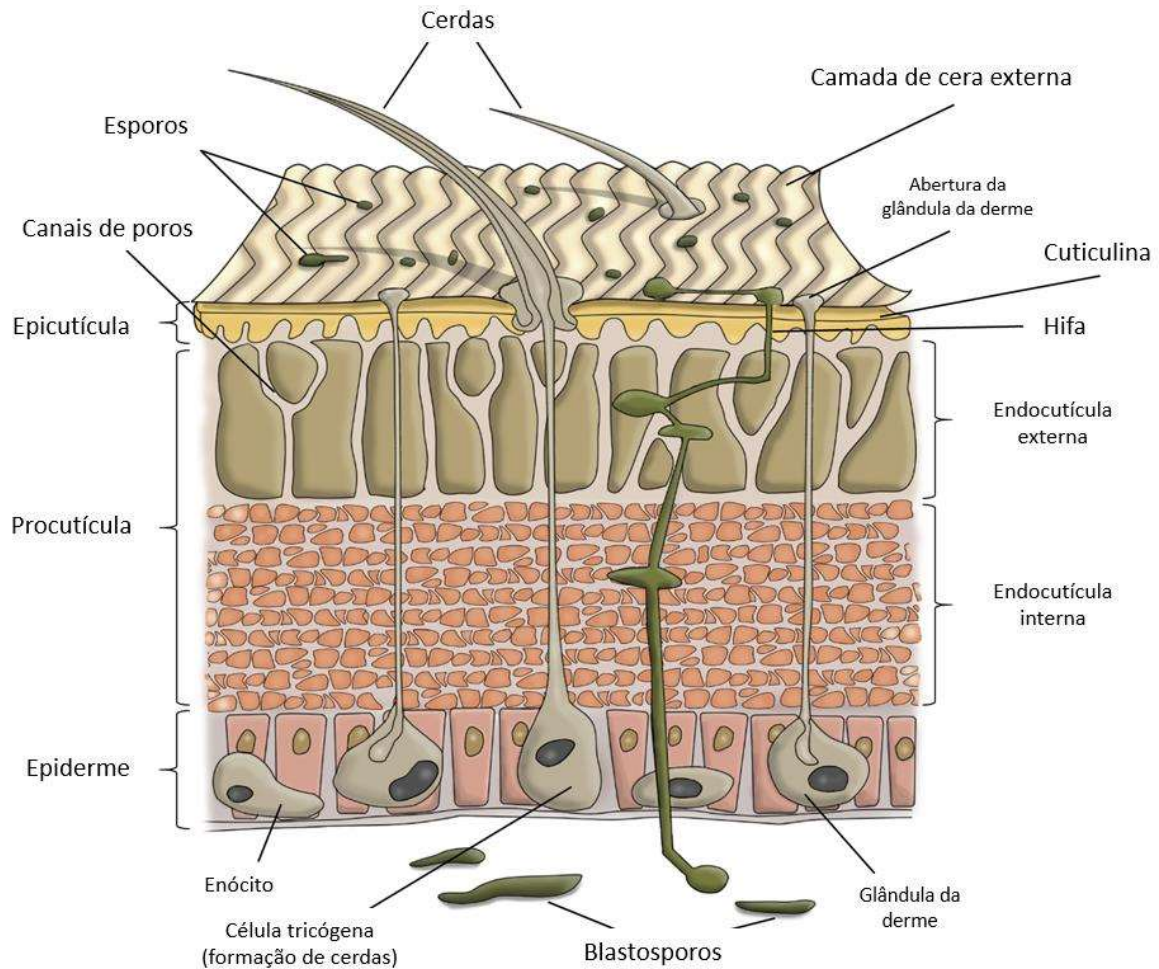
**Figura 2. Ciclo de infecção de *M. anisopliae* em hospedeiro artrópode (carrapato).** (1) adesão de conídios a superfície da cutícula do hospedeiro artrópode; (2) germinação do conídio pós adesão; (3) estrutura de tubo germinativo com formação (na extremidade) do apressório (4) processo de penetração exercido pelo apressório; (5) diferenciação das hifas de penetração em blastosporos; (6) completa colonização do hospedeiro por hifas de *M. anisopliae*; (7) extrusão de hifas para o meio externo posterior a completa infecção (8) formação de esporos na superfície do hospedeiro dispersão e reinício do ciclo. Blocos (1), (2), (3), (4), (6) e (7) gerados por microscopia eletrônica de varredura, campo (5) gerado por microscopia ótica, imagem (8) gerada por câmera convencional. CO – conídio; GT – tubo germinativo; AP – apressório; H – hifa; h – horas; d – dias. Fonte: (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). \* (as escalas de tempo são relativas ao hospedeiro em questão e às condições de infecção, podendo ser diferentes quando em outros artrópodes ou fatores ambientais divergentes).

O início do ciclo de infecção ocorre mediante a interação de esporos do fungo à cutícula/superfície externa do hospedeiro (Figura 2). A adesão do conídio à superfície do hospedeiro, a sua germinação e posterior penetração são etapas críticas no processo de infecção (STONE; BIDOCHKA, 2020). Portanto, a presença de proteínas de adesão, como

hidrofobinas e adesinas, são essenciais nesta etapa (WANG, C.; ST. LEGER, 2007; ZHOU *et al.*, 2021).

A germinação do conídio e posterior formação do apressório para a penetração são etapas metabolicamente ativas, onde o fungo deve utilizar reservas endógenas para o crescimento e desenvolvimento de estruturas especializadas (TSENG; CHUNG; TZEAN, 2014). Fatores ambientais também são essenciais nessa etapa, uma vez que o conídio só irá germinar em condições de temperatura e umidade favoráveis (NISHI *et al.*, 2013; ONSONGO *et al.*, 2019). O apressório, uma estrutura de penetração especializada, evolutivamente conservada em fungos entomopatogênicos e fitopatogênicos (THILINI CHETHANA *et al.*, 2021), diferencia-se a partir da extremidade do tubo germinativo. Essa estrutura combina pressão mecânica e a secreção de diversas enzimas hidrolíticas para romper a cutícula do artrópode (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; STONE; BIDOCHKA, 2020). Dentre as enzimas secretadas para a degradação de componentes da cutícula estão, entre outras, proteases, esterases, lipases, quitinases, aminopeptidases e dipeptidil peptidinas (JUNGES *et al.*, 2014).

Após o processo de penetração das hifas através da cutícula do hospedeiro (Figura 3), *M. anisopliae* se diferencia em estruturas unicelulares leveduriformes, conhecidas como blastosporos (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; STONE; BIDOCHKA, 2020; SYAZWAN *et al.*, 2021). Essa estrutura unicelular possibilita a rápida dispersão do fungo na hemolinfa do artrópode, além de facilitar a evasão da resposta imune, aquisição de nutrientes, colonização e os processos que culminarão na morte dos hospedeiros (ALKHAIBARI *et al.*, 2016; BERNARDO *et al.*, 2018). Com a morte do hospedeiro, o fungo transitará para um estado saprofítico, ativando preferencialmente rotas para o consumo dos nutrientes do artrópode (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).



**Figura 3. Adesão, penetração e dispersão na interação fungo-hospedeiro.** Representação simplificada das etapas iniciais do processo de infecção. O esporo interage, inicialmente, com a epicutícula do hospedeiro, camada mais externa do exoesqueleto de artrópodes. O processo exercido pelo apressório formado na extremidade do tubo germinativo é necessário para transportar as demais camadas da cutícula do hospedeiro (exocutícula, endocutícula e epiderme) até atingir a hemolinfa. Já na hemolinfa, as hifas são diferenciadas em blastosporos para dispersão (Adaptado de BEYS-DASILVA *et al.*, 2020).

Quando exauridos os nutrientes do hospedeiro, ocorre a extrusão do fungo que passa a se desenvolver na superfície externa do artrópode, com a mumificação do cadáver e a produção de novos conídios que serão liberados no ambiente (ZIMMERMANN, 2007b). O reinício do ciclo é essencial para a permanência de fungos entomopatogênicos no ambiente. Após a mumificação do cadáver e produção de novos conídios, ocorre o transporte passivo

de esporos para outros nichos, possibilitando assim a permanência do patógeno naquele habitat (ST. LEGER; WANG, 2020).

#### **1.4 Ocorrência de fungos entomopatogênicos**

Fungos entomopatogênicos são frequentemente encontrados colonizando plantas (LACEY *et al.*, 2015), raízes (IWANICKI *et al.*, 2019) e insetos (SOSA-GÓMEZ; LÓPEZ LASTRA; HUMBER, 2010). Entretanto, o ambiente cujo maior número de FEPs já foram descritos é o solo (CLIFTON *et al.*, 2015; STEINWENDER *et al.*, 2014). Umidade, temperatura, sais, micro e macro-nutrientes possibilitam a permanência a longo tempo e viabilidade de propágulos fúngicos neste ambiente. Dentre os fungos da ordem Hypocreales, constantemente recuperados do solo, estão: Clavicipitaceae (*e.g.*, *Metarhizium* e *Pochonia*), Cordycipitaceae (*e.g.*, *Cordyceps*, *Beauveria*, e *Isaria*), e Ophiocordycipitaceae (*e.g.*, *Ophiocordyceps* e *Tolyposcladium*) (KEPLER, R. *et al.*, 2013). O solo fornece um habitat para uma grande diversidade de microrganismos, que inclui espécies de FEPs (NIU *et al.*, 2019; QAYYUM *et al.*, 2021). Portanto, a ocorrência e distribuição destes fungos em solos são amplamente investigadas e já foram relatadas nos mais diversos ecossistemas. O conhecimento da composição de espécies autóctones e distribuição de fungos patogênicos de insetos são essenciais para avaliar o potencial no controle biológico em um ecossistema específico (BILGO *et al.*, 2018).

Fatores ambientais, sejam bióticos ou abióticos, são determinantes na ocorrência, distribuição e abundância de FEPs nos mais diversos biomas (HELMBERGER; SHIELDS; WICKINGS, 2017; PÉREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2014; QUESADA-MORAGA *et al.*, 2007). O isolamento, apesar de majoritariamente ocorrer em condições favoráveis, como as que

ocorrem nas florestas úmidas de temperatura estável (próxima a 25 °C) e grande diversidade de hospedeiros, já foi descrito em ambientes extremos, como as ilhas antárticas e desertos (SÁNCHEZ-PEÑA; LARA; MEDINA, 2011).

Outros fatores que influenciam no equilíbrio e composição da microbiota do solo ainda são importantes e destacáveis. Um exemplo são os impactos causados por resíduos de pesticidas e metais potencialmente tóxicos em solos naturais ou manejados (FIEDLER; SOSNOWSKA, 2017; WARI *et al.*, 2020). Em virtude disso, uma série de estudos sobre a ocorrência e diversidade de fungos patógenos de insetos no solo têm-se concentrado sobre as diferenças na composição de espécies entre as áreas definidas pelos tipos de habitat (por exemplo, solos cultivados, solos naturais etc.) (KOROSI *et al.*, 2019). A composição de minerais no solo, como a presença de silte e argila também foi avaliada como possível fator moderador da distribuição de FEPs no solo. Em 2021, Sharma e colaboradores identificaram que, além do pH, a abundância de íons de cálcio também estava atrelada a ocorrência de diferentes gêneros de FEPs em diferentes amostras analisadas (SHARMA *et al.*, 2021b).

A significância dos extensos esforços para descrição e prospecção de FEPs em amostras de solo se dá, substancialmente, pelo fato de que quase 90% das espécies de artrópodes pragas empenham uma parte do seu ciclo de vida no habitat do solo (KAYA; GAUGLER, 1993). Sendo assim, o solo é um importante reservatório de fungos entomopatogênicos e um ambiente fulcral no controle as populações de insetos pragas.

### ***1.5 Isolamento, identificação e aplicação de fungos entomopatogênicos***

Um dos principais métodos para avaliação da diversidade, bem como prospecção de novas espécies e linhagens de FEPs se dá pelo isolamento destes fungos empregando diferentes técnicas, podendo estas serem gerais ou específicas. A técnica de “*insect-bait*”, outrora usada na obtenção de nematoides com potencial de controle biológico, tem sido aplicada com sucesso na captura de FEPs mediante inserção de insetos junto a amostra estudada (MASOUDI *et al.*, 2020). Dentre as vantagens, destaca-se a capacidade de isolar fungos biologicamente ativos e que possuam atividade entomopatogênica (INGLIS; ENKERLI; GOETTEL, 2012). Porém, devido a limitação do uso de ordens de artrópodes, não é possível inferir a diversidade de espécies ou mesmo a quantidade de esporos viáveis no solo (SHARMA *et al.*, 2018).

Por outro lado, de forma generalista, é possível isolar FEPs mediante diluição do solo e plaqueamento em meios que facilitam na identificação de determinados gêneros (INGLIS; ENKERLI; GOETTEL, 2012; POSADAS *et al.*, 2012). Neste método é possível observar maior diversidade de fungos, bem como inferir a abundância relativa na porção amostrada. A técnica, entretanto, pode não inibir o aparecimento de fungos fitopatogênicos ou saprofíticos, dificultando a identificação e isolamento de FEPs (SHARMA *et al.*, 2021a). Neste sentido, é necessária, portanto, a adição de uma etapa extra, baseada nos princípios de Koch, para a confirmação do potencial entomopatogênico dos isolados obtidos (BUENO-PALLERO *et al.*, 2020). Após o isolamento, são comumente empregadas técnicas de identificação, sejam elas morfológicas (macro e microscópicas) ou mesmo moleculares, como o sequenciamento de regiões conservadas, como a região *ITS* (MASOUDI *et al.*, 2020; NIU *et al.*, 2019).

Tendo em vista que diversos fatores podem influenciar o sucesso da infecção de FEPs e que estes organismos podem ser isolados dos mais diversos ambientes, a utilização de fungos autóctones para o controle de populações de pragas do seu local de isolamento, surge como uma alternativa em potencial (QAYYUM *et al.*, 2021). Indiferentemente da técnica de isolamento, a aplicação de fungos autóctones garante a previa adaptação do microrganismo ao ambiente amostrado. Sendo assim, ordinariamente, a caracterização de FEPs isolados de determinadas áreas, busca, dentre outros fatores usuais (ex. alta virulência e esporulação), características fenotípicas associados ao ambiente de isolamento, como o desenvolvimento em condições estressantes de pH, temperatura, umidade e radiação UV (WU *et al.*, 2020).

Considerando-se as interações entre fungos, hospedeiro e ambiente, a seleção de isolados entomopatogênicos por meio da determinação da virulência, esporulação e resistência a diferentes condições estressantes é essencial para a proposição de novos bioinseticidas (ZAKI *et al.*, 2020).

### ***1.6 Fatores ambientais associados à ocorrência e aplicação de entomopatogênicos***

Dentre as características buscadas em FEPs com potencial de aplicação em controle biológico estão: (I) a virulência elevada contra diferentes artrópodes de importância na agricultura, pecuária e vetores de doenças humanas e animais (WANG, Y. chen; CHI, 2019); (II) a adaptação a uma ampla faixa de temperaturas, viabilizando sua aplicação em diversos biomas, climas e eventos sazonais (FERNANDES *et al.*, 2008a); (III) a resistência a radiação ultravioleta, viabilizando maior persistência do agente controlador no ambiente quando em vida livre (RANGEL *et al.*, 2018); (IV) a sua aplicabilidade no ambiente alvo, considerada a necessidade de sobrevivência junto a defensivos agrícolas, pesticidas e fungicidas

(FIEDLER; SOSNOWSKA, 2017), e (V) a sua viabilidade econômica (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). A utilização de agentes de controle biológico autóctones, baseada na adaptação evolutiva às diferentes condições é, portanto, um fator chave e que necessita ser considerado no sucesso de estratégias de controle biológico de pragas.

A temperatura pode ser um fator restritivo para a aplicação para grande parte dos entomopatógenos, uma vez que os microrganismos não possuem, imperativamente, mecanismos biológicos complexos para resistir a grandes variações de temperatura (WU *et al.*, 2020). Fernandes e colaboradores (2008) observaram que fungos entomopatogênicos isolados em regiões tropicais, distantes da região equatorial, apresentam, em sua maioria, maiores taxas de desenvolvimento e germinação em condições frias quando comparados aos fungos isolados em regiões equatoriais. Em contrapartida, isolados obtidos nas regiões próximas a linha do Equador, onde há pouca variação da incidência de radiação solar total, são mais tolerantes a radiação UV (BRAGA *et al.*, 2001).

Neste mesmo contexto, linhagens de *Metarhizium* spp. isoladas de regiões ao norte do Canadá apresentaram capacidade de desenvolvimento em condições de baixa temperatura (8 °C), enquanto linhagens de *Metarhizium* obtidas de solos agrícolas, de temperaturas mais elevadas, suportaram até 37 °C (DE CROOS; BIDOCHKA, 2001). Linhagens brasileiras de *Metarhizium*, ainda, foram capazes de tolerar temperaturas próximas a 40 °C (RANGEL *et al.*, 2010).

Além da temperatura, outros fatores ainda podem alterar a viabilidade e atividade biológica dos fungos entomopatogênicos, como a umidade, substrato e radiação ultravioleta (WU *et al.*, 2020). A temperatura atua sobre os fungos entomopatógenos afetando a produção, estabilidade na estocagem e patogenicidade nas condições de campo (LAZAROVITS; GOETTEL; VINCENT, 2007). A radiação solar é um agente causador da



inativação de entomopatógenos. Para *B. bassiana*, por exemplo, os efeitos deletérios da exposição à radiação ultravioleta podem ser extremamente danosos, visto que reduzem a persistência e viabilidade do fungo (KAISER *et al.*, 2019). Já, a presença de determinados substratos, pode possibilitar ou limitar a abundância de fungos em uma determinada porção de solo, por exemplo (QUESADA-MORAGA *et al.*, 2007).

Além da aplicação de fato, a exposição aos fatores ambientais tem se mostrado determinante para a estabilidade dos entomopatógenos na forma de formulações (FERNANDES *et al.*, 2015). A temperatura também é um fator de grande importância além da permanência e ocorrência ambiental, uma vez que atua sobre os patógenos afetando sua produção, estabilidade na estocagem e patogenicidade nas condições de campo (LOVETT; ST. LEGER, 2015).

### ***1.7 Controle microbiológico de pragas e o setor agrícola***

O setor agrícola é um componente importante no produto interno bruto (PIB) de diversos países, especialmente aqueles de larga escala territorial (KURESKI; MOREIRA; DA VEIGA, 2020). No Brasil, o agronegócio representa 21,4% do PIB (CNA, 2018). Entretanto, um dos fatores que freiam a maior produtividade no campo é a incidência de pragas agrícolas, sejam elas sazonais ou contínuas (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Os danos gerados pela ação de pragas agrícolas ocasionaram, no ano de 2014, uma perda estimada de 7,7% da produção agrícola total brasileira, valor próximo a US\$ 14,7 bilhões (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Entretanto, o uso indevido e exacerbado de defensivos químicos somado aos desequilíbrios ambientais e climáticos ocasiona, além do aparecimento de artrópodes resistentes aos pesticidas (KANNO *et al.*, 2020; LIRA *et al.*, 2020), um desequilíbrio ambiental de grandes proporções possibilitando a emergência de novas pragas (WANG, R.

*et al.*, 2020). Neste contexto, a aplicação de métodos microbiológicos para o controle de artrópodes-praga surge como uma alternativa viável, eficaz e ambientalmente correta (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

O sucesso da aplicação de controladores microbiológicos de pragas é refletido nas várias formulações comerciais disponíveis e empresas dedicadas ao controle de diversas espécies de artrópodes de interesse agrícola, sanitário-ambiental e econômico (FARIA; WRAIGHT, 2007). No Brasil, *M. anisopliae* é usado em grande escala para controlar um complexo de cigarrinhas, incluindo *Mahanarva fimbriolata* e *Mahanarva posticata* em cultivos de cana-de açúcar, e *Mahanarva fimbriolata*, *Deois flavopicta* e *Notozulia entreriana* em pastagens (MASCARIN *et al.*, 2019). *B. bassiana*, por outro lado, têm sido amplamente empregada no controle de *Bemisia tabaci*, *Cosmopolites sordidus*, *Dalbulus maidis*, *Tetranychus urticae* (MASCARIN *et al.*, 2019; ZIMMERMANN, 2007a). Os micoinseticidas, produtos de controle biológico a base de FEPs, representam 60% do total de 82 produtos registrados e comercializados no Brasil no âmbito de controladores biológicos. Destes 82, *Metarhizium* e *Beauveria* lideram a lista, com 24 e 13 produtos, respectivamente (MASCARIN *et al.*, 2019).

Ainda assim, no Brasil e no mundo, formulações de fungos entomopatogênicos para o controle de artrópodes, representam um mercado em forte expansão (MASCARIN *et al.*, 2019; SKINNER; PARKER; KIM, 2014). Segundo informações da Associação Brasileira de Empresas de Controle Biológico (ABCBio), de 2019, a expectativa de crescimento para o mercado destes produtos é de 20-25% a cada ano nos próximos 5 anos.

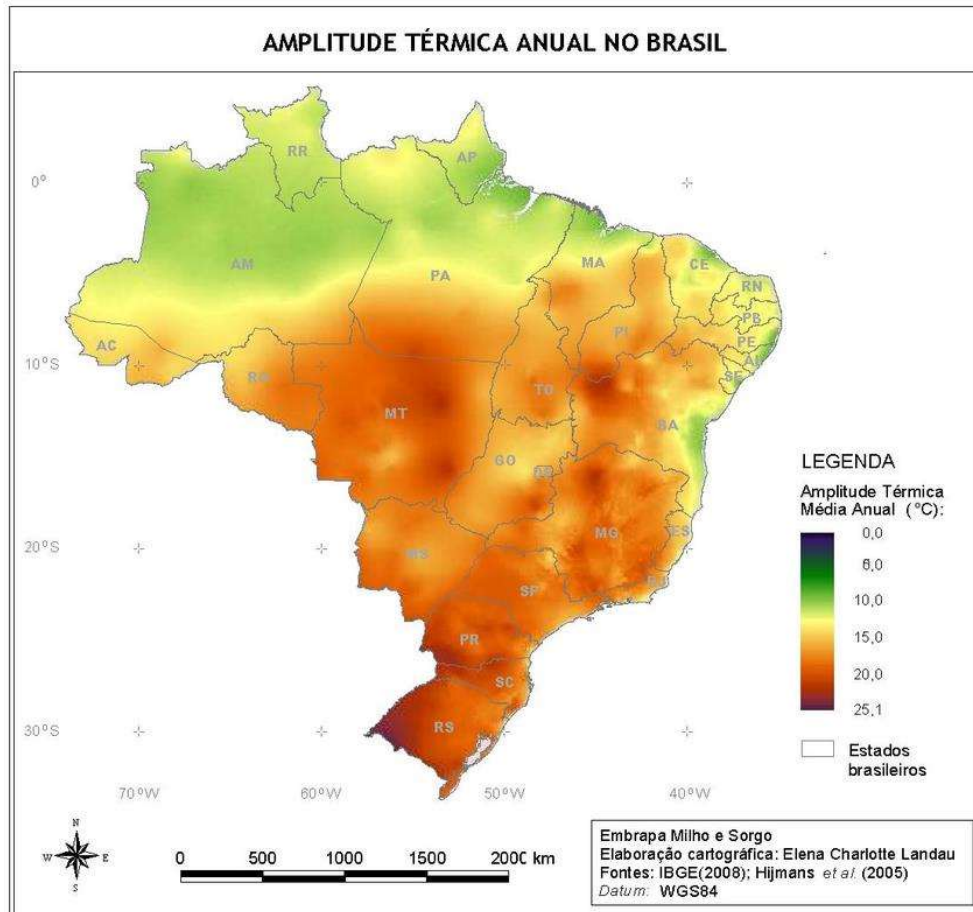
### ***1.8 Características geográficas do Estado do Rio Grande do Sul***

O estado do Rio Grande do Sul localiza-se no extremo sul do Brasil, em uma área de 281.730 km<sup>2</sup>, entre os paralelos 27° S e 33° S e os meridianos 49° O e 57° O, fazendo fronteira com a Argentina e o Uruguai (“Atlas Solar do Rio Grande do Sul,” 2018). O Estado divide-se em cinco grandes regiões: a planície costeira, marcada pela umidade oriunda do oceano atlântico e ocupada pela agricultura e por projetos florestais; a Serra Geral, com aproveitamentos agrícolas sobre elevadas altitudes; o pampa, de relevo ondulado e com predominância de campos naturais, estes majoritariamente ocupados pela atividade pecuária; a depressão central, coberta por florestas e atividades agrícolas; e o planalto das araucárias e das missões, cujo perfil econômico baseia-se na agricultura (“Clima do Rio Grande do Sul,” 2014; "Atlas Solar do Rio Grande do Sul," 2018).

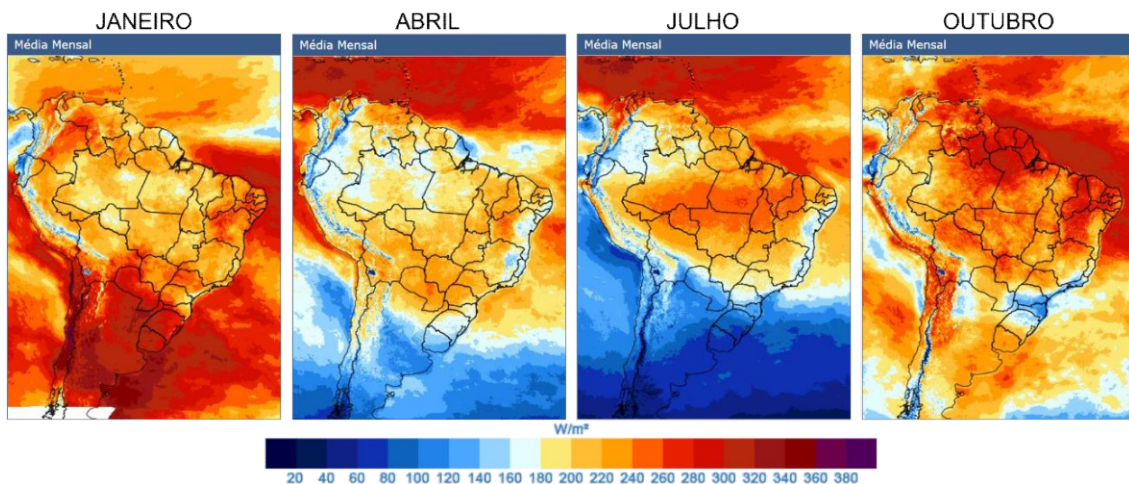
O clima pode ser dividido em dois tipos climáticos característicos: clima subtropical úmido e o clima oceânico. O clima oceânico, na porção Nordeste do estado, caracteriza-se por apresentar chuvas bem distribuídas durante o ano, com verões amenos. O clima subtropical úmido ocorre na maior parte do Rio Grande do Sul, apresentando chuvas bem distribuídas durante o ano e verões quentes (CLIMA DO RIO GRANDE DO SUL, 2014). Devido a predominância do clima subtropical úmido a temperatura média anual varia entre 18 °C e 19 °C. No entanto, alguns municípios do estado apresentam temperaturas elevadas durante o verão, próximo a 40 °C, enquanto outros, durante o inverno, apresentam temperaturas abaixo de 0 °C (“Instituto Nacional de Meteorologia, INMET”, período de janeiro a dezembro de 2018).

Além da amplitude térmica, devido a latitude de uma zona subtropical, o estado do Rio Grande do Sul também tem enorme variação da incidência de radiação solar total (Figura

4). Essa variação, além de estar atrelada com a amplitude térmica, também influencia na flutuação dos níveis de radiação ultravioleta (Figura 5), menor nos meses de inverno e maiores nos meses de verão, devido a inclinação terrestre em relação ao sol.



**Figura 4. Amplitude térmica média anual no território brasileiro.** Devido aos eventos de translação, o estado do Rio Grande do Sul apresenta a maior amplitude térmica média ao longo de um ano quando comparado aos demais estados do Brasil. O clima subtropical, definido por estações marcadas, possibilita a existência de massas polares nos meses de inverno e massas tropicais, quentes e úmidas, nos meses de verão (Fonte: Landau et al., 2009)



**Figura 5. Radiação solar global na América do Sul (2018).** Em virtude da inclinação terrestre, nos meses de outono e inverno, a radiação solar total na região sul do Brasil diminui drasticamente comparada aos meses de primavera e verão. Em comparação aos demais estados do Brasil, o estado do Rio Grande do Sul apresenta a maior variação da incidência de radiação solar ao longo do ano (Mapas: INPE, Sistema DAS: Radiação Global Solar 2018; coletados em 23/11/2021).

Por estes fatores, o estado do Rio Grande do sul apresenta variações importantes de temperaturas e condições climáticas em seus biomas. Tais condições singulares dificultam a aplicação de fungos entomopatogênicos ou quaisquer outros organismos como controladores biológicos. Neste cenário, considerada a possibilidade de empregar o isolamento de FEPs autóctones e adaptados ao ambiente, é extremamente necessário e relevante o estudo das populações de FEPs nesta área, focando na prospecção de novas linhagens com amplo espectro de ação capazes de suprir as necessidades apresentadas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

Avaliar a ocorrência, a diversidade e a distribuição de fungos entomopatogênicos no Estado do Rio Grande do Sul com foco na prospecção de agentes de controle biológico de pragas em amplo-espectro de condições.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- a. Isolar, por meio de técnicas de meios de cultivo e *insect-bait*, fungos entomopatogênicos presentes em amostras de solo de diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul;
- b. Identificar os fungos isolados empregando técnicas de microscopia, avaliando as estruturas de reprodução, e por técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento de regiões conservadas do DNA;
- c. Avaliar o desenvolvimento dos isolados sob diferentes condições de temperatura;
- d. Avaliar a virulência dos isolados em bioensaios na forma de *screening* com a larva-da-farinha (*Tenebrio molitor*);
- e. Analisar, por meio de bioensaios, o espectro de ação dos isolados selecionados contra a larva-da-farinha (*T. molitor*) em diferentes condições de temperatura.

### 3 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de manuscrito. O documento, formatado conforme as regras do periódico *Fungal Ecology*, revista científica para qual será submetido, descreve a ocorrência, distribuição e prospecção de fungos entomopatogênicos em solos do Estado do Rio Grande do Sul, priorizando a exploração de novos agentes de controle biológico de amplo-espectro de ação sob diferentes condições de temperatura. As figuras foram dispostas ao longo do texto com suas respectivas legendas a fim de facilitar a leitura e interpretação dos resultados. O material suplementar foi anexado após as referências.

**Título:** *Occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in soils of Rio Grande do Sul State, Brazil*

**Contribuição dos autores:**

MSC: delineamento experimental, coleta de material, aquisição de dados, análise e interpretação de dados, redação do manuscrito; FG e NS: delineamento experimental, coleta de material, aquisição dos dados, análise e interpretação dos dados, revisão crítica do manuscrito; AS: delineamento experimental, análise e interpretação dos dados, suporte financeiro, revisão crítica do manuscrito.

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

Fungos entomopatogênicos ocorrem nos mais diversos ecossistemas e regiões climáticas, de tropicais a polares (MEYLING; SCHMIDT; EILENBERG, 2012; NIU *et al.*, 2019; SEID *et al.*, 2019). Embora estes organismos tenham como principal característica a infecção de artrópodes, estes fungos também podem ocorrer como endofíticos (LACEY *et al.*, 2015), associados a plantas, ou mesmo como saprofiticos (STONE; BIDOCHKA, 2020), atuando na decomposição de matéria orgânica do solo. Dessa forma, ainda que o ciclo de infecção ocorra majoritariamente através da interação com o hospedeiro artrópode (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; STONE; BIDOCHKA, 2020), outros componentes ambientais são cruciais para a propagação e permanência do fungo no ambiente. O solo, neste contexto, atua como um reservatório para FEPs (SÁNCHEZ-PEÑA; LARA; MEDINA, 2011), uma vez que possui as condições necessárias para o desenvolvimento vegetativo e proteção dos propágulos (STONE; BIDOCHKA, 2020).

O solo, portanto, é comum objeto de estudo para a prospecção de FEPs de interesse biotecnológico (KOROSI *et al.*, 2019; QUESADA-MORAGA *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2021b). Entretanto, diversos fatores podem estar associados a ocorrência de FEPs, sejam bióticos ou abióticos. Além da temperatura (LOVETT; ST. LEGER, 2015), pH (BUENO-PALLERO *et al.*, 2020) e incidência de radiação UV (WU *et al.*, 2020), outros fatores, inerentes a composição do solo, são destacáveis: solos arenosos, por exemplo, favorecem a perda de conídios pela lixiviação, ao passo que solos com maiores teores de silte e argila possibilitam a permanência destes fungos devido à adsorbância dos conídios as partículas de argila (QUESADA-MORAGA *et al.*, 2007).



O papel do ambiente como modulador na evolução e adaptação de microrganismos, apesar de já reconhecido e validado (BERNARDO-CRAVO *et al.*, 2020), ainda é pouco considerado na prospecção de FEPs dentro dos interesses biotecnológicos. Neste trabalho, investigamos a ocorrência e distribuição de FEPs em solos do Estado do Rio Grande do Sul. Esta região apresenta elevada variação térmica e papel destacado na agricultura brasileira, sendo este Estado dependente de estratégias de controle de pragas. A partir de 89 amostras de solo oriundas de 68 diferentes locais, foi possível isolar 484 fungos filamentosos. Destes, 470 foram obtidos através da técnica de diluição e plaqueamento em meio *Oatmeal Agar* (OA) e 14 pelo método de *insect-bait*. A confirmação do potencial entomopatogênico dos 470 fungos obtidos por meio OA, através da utilização de larvas de *T. molitor*, revelou 206 FEPs putativos.

Com base nas características morfológicas macro e microscópicas e na análise das sequências de rDNA-*ITS*, *TEF* e *Bloc*, foram identificados 13 diferentes gêneros: *Beauveria*, *Blackwellomyces*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Metapochonia*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Purpureocillium*, *Tolypocladium* e *Verticillium*. O método de *insect-bait*, entretanto, revelou exclusivamente 14 isolados pertencentes ao gênero *Metarhizium*.

A técnica de isolamento a partir de meios semi-seletivos possibilita a identificação de diferentes gêneros de FEPs (INGLIS; ENKERLI; GOETTEL, 2012; POSADAS *et al.*, 2012), entretanto, a técnica pode ser de laboriosa e de difícil interpretação imediata, uma vez que necessita etapas adicionais para a confirmação do potencial entomopatogênico dos fungos isolados (BUENO-PALLERO *et al.*, 2020). A técnica de *insect-bait*, em contrapartida, quando aplicada com número reduzido de ordens de insetos pode ser limitada para o isolamento e análise de diversidade (MASOUDI *et al.*, 2020; VEGA; KAYA, 2012).

Como observado, FEPs foram isolados em apenas 15,73% das amostras estudadas quando o método de *insect-bait* foi aplicado. Bueno-Pallero e colaboradores (2020) analisaram a ocorrência de FEPs por diferentes métodos de captura na região de Algarve, Portugal. Os autores relataram, da mesma forma, maior recuperação de FEPs quando meios seletivos foram empregados em comparação a métodos de “*bait*”. Todavia, Masoudi e colaboradores (2020) ressaltaram os pontos positivos de métodos baseados na captura empregando insetos, sendo, o principal, a possibilidade da obtenção de linhagens com maior bioatividade e resistência em condições reais de aplicação.

Ao analisar a distribuição dos FEPs isolados e identificados, constatamos que, ao dividir o RS em 3 regiões climáticas, tomando como base a média anual de temperatura para o ano de 2018, há pouca diferença na variação espacial da diversidade de FEPs. Os resultados obtidos pelo índice de Shannon-Wiener, utilizado para mensurar a variabilidade espacial de diversidade, foram similares na comparação entre as regiões média (17,8 – 19,8 °C) e fria (< 17,8 °C). Para a região quente (> 19,8 °C), foi observado o menor índice entre as três avaliadas, no entanto, é válido ressaltar o menor número amostral desta região. O mesmo efeito foi observado por Niu e colaboradores (2019) ao analisar a distribuição espacial de FEPs no sul da China.

Para observar a probabilidade de recuperação dos quatro gêneros mais abundantes encontrados (*Beauveria*, *Fusarium*, *Metarhizium* e *Purpureocillium*), foi calculada a abundância relativa em função do número de amostras de cada região separadamente. Para o gênero *Metarhizium*, foi observada maior abundância relativa nas regiões frias, exclusivamente. O oposto foi observado para os isolados do gênero *Purpureocillium*, mais abundantes nas regiões médias e quentes. Ao passo que, os gêneros *Beauveria* e *Fusarium*

não apresentaram tendência de distribuição, sendo estes fungos isolados em proporções similares nas diferentes regiões analisadas.

Além do levantamento da diversidade e distribuição de FEPs no RS, neste trabalho também foi priorizada a procura por potenciais agentes de controle de pragas com espectro de ação não-específico, principalmente aqueles capazes de apresentar atividade entomopatogênica em diferentes condições de temperatura. Para isso, isolados dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* foram avaliados quanto a capacidade de desenvolvimento nas condições de 12, 22, 28 e 37 °C. A partir de 46 isolados testados, dez foram selecionados para ensaios posteriores. Todos os isolados selecionados do gênero *Beauveria* (AS169, AS220, AS272 e AS461) apresentaram crescimento na menor temperatura avaliada (12 °C). A resistência, capacidade de germinação e desenvolvimento em baixas temperaturas (até 5 °C) para o gênero *Beauveria* já havia sido descrita por Fernandes e colaboradores (2008a) ao avaliar a termotolerância de linhagens do gênero. Em contrapartida, isolados do gênero *Metarhizium* (AS218, AS230, AS262, AS383, ASMT9 e ASMT10), apresentaram dois padrões distintos; (I) crescimento a 12 e 22 °C (AS218, AS262 e ASMT10) e, (II) crescimento a 37 °C (AS230, ASMT9 e ASMT10). Notavelmente, os isolados do grupo I pertencem à espécie *M. brunneum*, enquanto os isolados do grupo II, à espécie *M. robertsii*. Estes resultados corroboram os obtidos por Couceiro e colaboradores (2021). O estudo, que observou a resistência à radiação UV e temperatura de diferentes isolados de *Metarhizium* spp., observou o crescimento de linhagens da espécie *M. brunneum* em temperaturas próximas a 25 °C, enquanto linhagens de *M. robertsii* tiveram maior desenvolvimento a 33 °C. A distribuição geográfica de ambas as espécies reflete a capacidade de desenvolvimento observada *in vitro*. A espécie *M. brunneum* apresenta maior abundância em climas temperados, sendo isolada em maior frequência em regiões temperadas, como a Dinamarca

(STEINWENDER *et al.*, 2014). *M. robertsii*, em contrapartida, é isolado com maior frequência em regiões tropicais, como o Brasil (RIGUETTI ZANARDO BOTELHO *et al.*, 2019).

A relação entre a ocorrência de FEPs e a região da qual foram isolados pode não possuir associações claras, uma vez que a diversidade de fungos é de difícil comparação, seja quantitativa e/ou qualitativa, principalmente devido as inúmeras variáveis associadas a amostra e ao modelo experimental empregado. Entretanto, condições ambientais e/ou fatores estressantes podem atuar na modulação e plasticidade fenotípica de FEPs, além de moldar evolutivamente tais organismos (GASMI *et al.*, 2021). Estas condições, por sua vez, possuem padrões definidos ao longo do globo terrestre. McGuire e Northfield (2020) revisaram diferentes linhagens dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*, devido sua importância agrícola, e propuseram possíveis associações entre a região de ocorrência e a adaptação destes fungos a diferentes condições. De acordo com os autores, tomando como base a latitude, duas hipóteses podem ser propostas: (i) Fatores abióticos são determinantes primários da estrutura genética de FEPs em latitudes mais elevadas, devido a necessidade de adaptação destes fungos à sazonalidade e as condições ambientais extremas; (ii) Inversamente, os fatores bióticos (interações fungo-hospedeiro e outras interações *cross-kingdom*) são os principais reguladores da estrutura genética da população de FEPs em latitudes mais baixas, devido à ausência de variação climática extrema e da perenidade de populações artrópodes.

Neste contexto, o estado do Rio Grande do Sul, latitude 30° Sul, pode apresentar ambos os fatores descritos. A predominância do clima subtropical, possibilita a existência de uma ampla diversidade de artrópodes e, ao mesmo tempo, uma variação climática notável, principalmente em função da elevada amplitude térmica. Diante disso, este trabalho ainda

propôs avaliar os isolados selecionados quanto ao crescimento vegetativo em diferentes temperaturas em testes de virulência de condições abióticas variáveis.

Ao analisar a virulência contra *T. molitor* de 10 isolados oriundos de solos do estado do RS, diferentes padrões de sobrevivência foram observados. Como esperado, na condição de 28 °C, todos os isolados apresentaram elevada virulência, sendo ASMT9 (*M. robertsii*), AS218 (*M. brunneum*) e AS230 (*M. robertsii*) os mais promissores. Tais isolados apresentaram LT50 de 2,40; 2,43 e 2,43 dias, respectivamente. Na condição de 22 °C, todavia, foi observada uma rápida diminuição na mortalidade dos insetos para alguns isolados. O efeito diminutivo, no entanto, foi observado em maior grau para as linhagens controle (CG46 e E6). Ainda assim, na temperatura de 22 °C, os isolados AS218, AS262, AS272 e ASMT10 não apresentaram diferença significativa comparado ao LT50 na temperatura de 28 °C. Este resultado aponta para a possibilidade do emprego destas linhagens com igual eficácia em diferentes condições de temperatura. Por fim, na menor temperatura avaliada, 16 °C, a alteração da virulência foi drástica para todos os isolados e controles testados. Nesta condição, dez dias após a infecção, não foi possível determinar o LT50 para os controles, sendo AS218 e AS272 os isolados com maior virulência nesta temperatura, apresentando LT50 de 6,01 e 6,16 dias, respectivamente.

Notavelmente, os isolados do gênero *Beauveria*, cujo crescimento a 12 °C foi observado, não apresentaram destacada virulência total e relativa as demais temperaturas na condição de 16 °C para o modelo de hospedeiro testado. Para os isolados pertencentes ao gênero *Metarhizium*, os mesmos padrões observados no crescimento vegetativo foram observados em função da virulência. Isolados da espécie *M. robertsii*, cuja seleção ocorreu pela capacidade de desenvolvimento a 37 °C, apresentaram maior eficácia (menor LT50) na maior temperatura testada (28 °C). Por outro lado, isolados da espécie *M. brunneum*,

selecionados pela capacidade de desenvolvimento a 12 °C e/ou equivalência dos crescimentos a 22 e 28°C, apresentaram maior eficácia em temperaturas menores (16 e 22 °C).

Por fim, é possível destacar que fatores intrínsecos da evolução de espécies de FEPs são marcantes na biologia destes fungos, independentemente dos fatores abióticos dos ambientes da qual são isolados. Entretanto, é fundamentada a contribuição e a influência do ambiente como modulador de características fenotípicas destas espécies. Os isolados de *M. robertsii*, por exemplo, apesar de apresentarem tendência de crescimento em temperaturas mais elevadas, de forma similar aos controles (*M. anisopliae* CG46 e E6), mostraram maior plasticidade, sendo possível determinar o LT50 mesmo na condição mais extrema (16 °C), diferentemente dos controles. Dessa forma, ainda que existam mecanismos intrínsecos do gênero e/ou espécie, o ambiente pode induzir a adaptação destas, possibilitando a exploração de linhagens com potencial no controle biológico de pragas em amplo-espectro.

## 5 CONCLUSÕES

O presente trabalho contribui para o conhecimento da diversidade de fungos em regiões subtropicais e de alta variabilidade climática, além de fornecer novos isolados com potencial biotecnológico no controle de pragas. Embora que ainda possam ser necessários experimentos futuros, os dados obtidos apontam que:

- Diferentes gêneros de fungos entomopatogênicos são passíveis de isolamento em amostras de solo;
- A técnica de plaqueamento em meio semi-seletivo mostrou-se mais eficiente para o isolamento de fungos entomopatogênicos, em relação à diversidade e abundância;
- A técnica de *insect-bait*, apesar de possibilitar o isolamento de fungos ativos em amostras de solo, pode ser limitada para fins de isolamento em quantidade e diversidade;
- A distribuição de FEPs em ambientes de variáveis condições de temperatura não necessariamente reflete nos fenótipos observados *in vitro* e *in vivo*;
- No contexto de fungos entomopatogênicos, o ambiente pode atuar como modulador da adaptação em diferentes características da biologia de FEPs, mesmo que estes possuam fenótipos característicos da espécie;
- A localização geográfica do Estado do Rio Grande do Sul possibilita a existência de fungos com potencial entomopatogênico de elevada virulência, bem como, passíveis de aplicação no controle biológico em diferentes condições de temperatura.

## 6 PERSPECTIVAS

Uma vez verificada a existência de isolados com desenvolvimento e virulência em diferentes condições de temperatura, como AS272 (*B. bassiana*) e AS218 (*M. brunneum*), os próximos passos focam em avaliar demais fatores associados à aplicação na forma de controladores biológicos, como:

- Avaliar a resistência dos isolados a radiação ultravioleta (UVA-UVB, 280-400 nm);
- Avaliar o potencial de controle biológico de isolados selecionados contra a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*).



## 7 BIBLIOGRAFIA

ALKHAIBARI, A. M. *et al.* *Metarhizium brunneum* Blastospore Pathogenesis in *Aedes aegypti* Larvae: Attack on Several Fronts Accelerates Mortality. **PLoS Pathogens**, [s. l.], 2016. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005715>

ATLAS SOLAR: Rio Grande do Sul, elaborado por Camargo Schubert Engenheiros Associados, SMERS, UERGS, PUCRS, UFRGS. – Curitiba: Camargo Schubert; Porto Alegre: SMERS, 2018.

BERNARDO-CRAVO, A. P. *et al.* **Environmental Factors and Host Microbiomes Shape Host–Pathogen Dynamics.** [S. l.: s. n.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.010>

BERNARDO, C. C. *et al.* Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s. l.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.001>

BEYS-DA-SILVA, W. O. *et al.* **Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** [S. l.: s. n.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>

BILGO, E. *et al.* Native entomopathogenic *Metarhizium* spp. from Burkina Faso and their virulence against the malaria vector *Anopheles coluzzii* and non-target insects. **Parasites and Vectors**, [s. l.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2796-6>

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, [s. l.], 2009. Available at: <https://doi.org/10.3852/07-202>

BOOMSMA, J. J. *et al.* Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162054>

BRAGA, G. U. L. *et al.* Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate**

**Pathology**, [s. l.], 2001. Available at: <https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5048>

BUENO-PALLERO, F. Á. *et al.* Patterns of occurrence and activity of entomopathogenic fungi in the algarve (Portugal) using different isolation methods. **Insects**, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/insects11060352>

CHANDLER, D. Basic and Applied Research on Entomopathogenic Fungi. *In: MICROBIAL CONTROL OF INSECT AND MITE PESTS: FROM THEORY TO PRACTICE.* [S. l.: s. n.], 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00005-6>

CLIFTON, E. H. *et al.* Abundance of soil-borne entomopathogenic fungi in organic and conventional fields in the Midwestern USA with an emphasis on the effect of herbicides and fungicides on fungal persistence. **PLoS ONE**, [s. l.], 2015. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133613>

CLIMA DO RIO GRANDE DO SUL. **Boletim Geográfico do Rio Grande do Sul**, [s. l.], 2014.

COUCEIRO, J. da C. *et al.* UV-B Radiation Tolerance and Temperature-Dependent Activity Within the Entomopathogenic Fungal Genus *Metarhizium* in Brazil. **Frontiers in Fungal Biology**, [s. l.], 2021. Available at: <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.645737>

DAVIDSON, E. W. History of insect pathology. *In: INSECT PATHOLOGY.* [S. l.: s. n.], 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00002-6>

DE CROOS, J. N. A.; BIDOCHKA, M. J. Cold-induced proteins in cold-active isolates of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, [s. l.], 2001. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0953756201004099>

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, [s. l.], 2000. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0953756299001756>

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. **Suggestions for unifying the terminology in biological control.** [S. l.: s. n.], 2001. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>

- EVANS, H. C.; ELLIOT, S. L.; BARRETO, R. W. Entomopathogenic fungi and their potential for the management of *aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Americas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170369>
- FARIA, M. R. d.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, [s. l.], 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- FERNANDES, É. K. K. *et al.* Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], 2008a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.011>
- FERNANDES, É. K. K. *et al.* Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], 2008b. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.011>
- FERNANDES, É. K. K. *et al.* Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, [s. l.], 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z>
- FIEDLER, Z.; SOSNOWSKA, D. Side effects of fungicides and insecticides on entomopathogenic fungi in vitro. **Journal of Plant Protection Research**, [s. l.], 2017. Available at: <https://doi.org/10.1515/jppr-2017-0048>
- GASMI, L. *et al.* Gene diversity explains variation in biological features of insect killing fungus, *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, [s. l.], 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78910-1>
- HELMBERGER, M. S.; SHIELDS, E. J.; WICKINGS, K. G. **Ecology of belowground biological control: Entomopathogenic nematode interactions with soil biota**. [S. l.: s. n.], 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.013>
- HUSSAIN, A. *et al.* Mycoinsecticides: Potential and Future Perspective. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.2174/2212798406666140613113905>

INGLIS, G. D.; ENKERLI, J.; GOETTEL, M. S. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi. Hypocreales. *In*: MANUAL OF TECHNIQUES IN INVERTEBRATE PATHOLOGY. [s. l.: s. n.], 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00007-5>

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). **Banco de dados meteorológicos do INMET**. Estações automáticas e manuais, temperatura média no período de janeiro a dezembro do ano de 2018. Coletado em 02/10/2021. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/paginas/catalogoaut>

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Divisão de Satélites e Sistemas Ambientais (DSA)**. Radiação solar e terrestre. Média mensal solar global, 2018. Coletado em 23/11/2021. Disponível em: <http://satelite.cptec.inpe.br/radiacao/>

IWANICKI, N. S. *et al.* Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects, soil and sugarcane roots. **Scientific Reports**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38594-8>

JUNGES, Â. *et al.* Genomic analyses and transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **PLoS ONE**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107864>

KAISER, D. *et al.* Efficiency of natural substances to protect *Beauveria bassiana* conidia from UV radiation. **Pest Management Science**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/ps.5209>

KANNO, R. H. *et al.* Low risk of resistance evolution of *Spodoptera frugiperda* to chlorfenapyr in Brazil. **Journal of Pest Science**, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01165-x>

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], 1993. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.38.010193.001145>

KEPLER, R. *et al.* The phylogenetic placement of hypocrealean insect pathogens in the genus *Polycephalomycetes*: An application of One Fungus One Name. **Fungal Biology**, [s. l.],

2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.06.002>

KEPLER, R. M. *et al.* Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.3852/13-319>

KOROSI, G. A. *et al.* Occurrence and diversity of entomopathogenic fungi (*Beauveria* spp. and *Metarhizium* spp.) in Australian vineyard soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.05.002>

KURESKI, R.; MOREIRA, V. R.; DA VEIGA, C. P. Agribusiness participation in the economic structure of a Brazilian region: Analysis of GDP and indirect taxes. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1590/1806-9479.2020.207669>

LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>

LANDAU, Elena. *et al.* Geoespacialização da amplitude térmica no Brasil. **Anais do III Simpósio Internacional de Climatologia, Volume: 3**. 2009. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/280558946\\_Geoespacializacao\\_da\\_amplitude\\_termica\\_no\\_Brasil](https://www.researchgate.net/publication/280558946_Geoespacializacao_da_amplitude_termica_no_Brasil)

LAZAROVITS, G.; GOETTEL, M. S.; VINCENT, C. **Biological control: A global perspective**. [S. l.: s. n.], 2007. Available at: <https://doi.org/10.1079/9781845932657.0000>

LIMA, E. A. de L.-A. Aspectos taxonômicos e citológicos de hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], 1989. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0074-02761989000700004>

LIRA, E. C. *et al.* Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest Management Science**, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1002/ps.5812>

LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. **Current Genetics**, [s. l.], 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0447-9>

- MASCARIN, G. M. *et al.* **Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil.** [*S. l.: s. n.*], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>
- MASOUDI, A. *et al.* Meta-Analysis and Evaluation by Insect-Mediated Baiting Reveal Different Patterns of Hypocrealean Entomopathogenic Fungi in the Soils From Two Regions of China. **Frontiers in Microbiology**, [*s. l.*], 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01133>
- MCGUIRE, A. V.; NORTHFIELD, T. D. **Tropical Occurrence and Agricultural Importance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*.** [*S. l.: s. n.*], 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00006>
- MEYLING, N. V.; SCHMIDT, N. M.; EILENBERG, J. Occurrence and diversity of fungal entomopathogens in soils of low and high Arctic Greenland. **Polar Biology**, [*s. l.*], 2012. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00300-012-1183-6>
- NISHI, O. *et al.* Comparison of the germination rates of *Metarhizium* spp. conidia from Japan at high and low temperatures. **Letters in Applied Microbiology**, [*s. l.*], 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/lam.12150>
- NIU, X. *et al.* Biodiversity of entomopathogenic fungi in the soils of south china. **Microorganisms**, [*s. l.*], 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090311>
- OLIVEIRA, C. M. *et al.* Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, [*s. l.*], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.022>
- ONSONGO, S. K. *et al.* Performance of three isolates of *Metarhizium Anisopliae* and their virulence against *Zeugodacus Cucurbitae* under different temperature regimes, with global extrapolation of their efficiency. **Insects**, [*s. l.*], 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/insects10090270>
- PAULA, A. R. *et al.* The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites and Vectors**, [*s. l.*], 2011. Available at:

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-8>

PÉREZ-GONZÁLEZ, V. H. *et al.* Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.004>

POSADAS, J. B. *et al.* A novel dodine-free selective medium based on the use of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) to isolate *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* sensu lato and *paecilomyces lilacinus* from soil. **Mycologia**, [s. l.], 2012. Available at: <https://doi.org/10.3852/11-234>

QAYYUM, M. A. *et al.* Diversity and correlation of entomopathogenic and associated fungi with soil factors. **Journal of King Saud University - Science**, [s. l.], 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101520>

QUESADA-MORAGA, E. *et al.* Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, [s. l.], 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.06.006>

RANGEL, D. E. N. *et al.* Fungal strategies for dealing with environment- and agriculture-induced stresses. **Fungal Biology**, [s. l.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.02.002>

RANGEL, D. E. N. *et al.* Thermotolerance of germlings and mycelium of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium* spp. and mycelial recovery after heat stress. **Journal of Basic Microbiology**, [s. l.], 2010. Available at: <https://doi.org/10.1002/jobm.200900430>

REHNER, S. A. *et al.* Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, [s. l.], 2011. Available at: <https://doi.org/10.3852/10-302>

RIGUETTI ZANARDO BOTELHO, A. B. *et al.* *Metarhizium* species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. **Fungal Ecology**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.07.004>

RODRIGUES, J. *et al.* Simple method to detect and to isolate entomopathogenic fungi (Hypocreales) from mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107581>

ROHRLICH, C. *et al.* Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*. **PLoS ONE**, [s. l.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199199>

SÁNCHEZ-PEÑA, S. R.; LARA, J. S. J.; MEDINA, R. F. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. **Journal of Insect Science**, [s. l.], 2011. Available at: <https://doi.org/10.1673/031.011.0101>

SANDHU, S. S. *et al.* Myco-Biocontrol of Insect Pests: Factors Involved, Mechanism, and Regulation. **Journal of Pathogens**, [s. l.], 2012. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/126819>

SANJUAN, T. I. *et al.* Five new species of entomopathogenic fungi from the Amazon and evolution of neotropical *Ophiocordyceps*. **Fungal Biology**, [s. l.], 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.010>

SBARAINI, N. *et al.* Secondary metabolite gene clusters in the entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae*: Genome identification and patterns of expression in a cuticle infection model. **BMC Genomics**, [s. l.], 2016. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3067-6>

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. [S. l.: s. n.], 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>

SEID, A. M. *et al.* Temperature-dependent germination, growth and co-infection of *Beauveria* spp. isolates from different climatic regions. **Biocontrol Science and Technology**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1564812>

SHARMA, L. *et al.* **Advances in entomopathogen isolation: A case of bacteria and fungi.** [S. l.: s. n.], 2021a. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010016>

SHARMA, L. *et al.* Effect of soil chemical properties on the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in Portuguese grapevine fields. **Pathogens**, [s. l.], 2021b. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens10020137>

SHARMA, L. *et al.* Entomopathogenic fungi in Portuguese vineyards soils: Suggesting a ‘*Galleria-Tenebrio*-bait method’ as bait-insects *galleria* and *tenebrio* significantly



- underestimate the respective recoveries of *metarhizium (robertsii)* and *beauveria (bassiana)*. **MycoKeys**, [s. l.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.3897/mycokeys.38.26970>
- SINGH, D.; RAINA, T. K.; SINGH, J. Entomopathogenic fungi: An effective biocontrol agent for management of insect populations naturally. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [s. l.], 2017.
- SKINNER, M.; PARKER, B. L.; KIM, J. S. Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. In: INTEGRATED PEST MANAGEMENT: CURRENT CONCEPTS AND ECOLOGICAL PERSPECTIVE. [S. l.: s. n.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00011-7>
- SOSA-GÓMEZ, D. R.; LÓPEZ LASTRA, C. C.; HUMBER, R. A. **An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil**. [S. l.: s. n.], 2010. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9288-3>
- ST. LEGER, R. J.; WANG, J. B. *Metarhizium* : jack of all trades, master of many . **Open Biology**, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsob.200307>
- STEINWENDER, B. M. *et al.* Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.09.002>
- STONE, L. B. L.; BIDOCHKA, M. J. **The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications**. [S. l.: s. n.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10968-3>
- SYAZWAN, S. A. *et al.* Interaction between *metarhizium anisopliae* and its host, the subterranean termite *Coptotermes curvignathus* during the infection process. **Biology**, [s. l.], 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/biology10040263>
- THILINI CHETHANA, K. W. *et al.* **Diversity and function of appressoria**. [S. l.: s. n.], 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens10060746>
- TIAGO, P. V.; OLIVEIRA, N. T. de; LIMA, E. Á. de L. A. Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. **Ciência Rural**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0103-84782014000400012>

TSENG, M. N.; CHUNG, C. L.; TZEAN, S. S. Mechanisms relevant to the enhanced virulence of a dihydroxynaphthalene- melanin metabolically engineered entomopathogen. **PLoS ONE**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090473>

VEGA, F. E.; KAYA, H. K. **Insect Pathology**. [S. l.: s. n.], 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/C2010-0-64964-9>

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], 2007. Available at: <https://doi.org/10.1128/EC.00409-06>

WANG, C.; ST LEGER, R. J. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. **Nature Biotechnology**, [s. l.], 2007. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt1357>

WANG, R. *et al.* Potential distribution of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in China and the major factors influencing distribution. **Global Ecology and Conservation**, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00865>

WANG, Y. chen; CHI, D. fu. Screening of high-virulent entomopathogenic fungal strains to infect *Xylotrechus rusticus* larvae. **3 Biotech**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1602-2>

WARI, D. *et al.* Augmentation and compatibility of *Beauveria bassiana* with pesticides against different growth stages of *Bemisia tabaci* (Gennadius); an in vitro and field approach. **Pest Management Science**, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1002/ps.5881>

WU, S. *et al.* Environmental tolerance of entomopathogenic fungi: A new strain of *cordyceps javanica* isolated from a whitefly epizootic versus commercial fungal strains. **Insects**, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/insects11100711>

ZAKI, O. *et al.* **Limiting factors of mycopesticide development**. [S. l.: s. n.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104220>

ZHAO, H.; LOVETT, B.; FANG, W. Genetically Engineering Entomopathogenic Fungi. **Advances in Genetics**, [s. l.], 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.001>

ZHOU, Q. *et al.* Comparative roles of three adhesin genes (adh1–3) in insect-pathogenic lifecycle of *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], 2021. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11420-w>

ZIMMERMANN, G. **Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii***. [S. l.: s. n.], 2007a. Available at: <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>

ZIMMERMANN, G. **Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae***. [S. l.: s. n.], 2007b. Available at: <https://doi.org/10.1080/09583150701593963>

## 8 CURRICULUM VITAE RESUMIDO

CAMARGO, MATHEUS DA SILVA; DA SILVA CAMARGO, MATHEUS; CAMARGO,  
M. S.;

### **Dados pessoais:**

**Nome:** Matheus da Silva Camargo

**Local e data de Nascimento:** Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

03/06/1997

**Endereço profissional:** Avenida Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Centro de  
Biotecnologia, Prédio 43421, Laboratório 217

**Telefone profissional:** (51) 3308-6079

**E-mail:** mtsc.camargo@gmail.com

### **Formação:**

Técnico em Controle Ambiental (IFSUL, 2011 – 2014)

Bacharelado em Biotecnologia (UFRGS, 2015 – 2018)

**Estágios:**

Química Analítica Aplicada (2016/1 – 2018/1) – Bolsista IC FAPERGS (UFRGS) – Profa. Dra. Juliana Severo Fagundes Pereira– Uso de micro-organismos imobilizados em nanopartículas magnéticas para melhoria da qualidade de águas produzidas.

Biologia Celular e Molecular (2018/2 – 2018/2) – Bolsista BIC CAPES (UFRGS) – Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein – Obtenção de consórcios microbianos e caracterização de genes com aplicação biotecnológica em biorremediação ambiental costeira e marinha.

Biotecnologia molecular (2018/2) – Estágio curricular (Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico) – Sara Regina Allebrandt – Desenvolvimento de estratégias para o controle de qualidade microbiológico.

**Artigos completos publicados**

SOUZA, J. P. et al. Sample preparation strategies for petroleum coke digestion and further cerium and lanthanum determination by DSN-ICP-OES. JOURNAL OF ANALYTICAL ATOMIC SPECTROMETRY, v. 33, p. 1284-1291, 2018.

SBARAINI, N. et al. An efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method for *Simplicillium subtropicum* (Hypocreales: Cordycipitaceae). GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, 44(3), e20210073, 2021.