

SEPARAÇÃO DE ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)
SOROK., ATRAVÉS DA ANÁLISE FENÉTICA¹

Sergio B. Alves²

Sinval Silveira Neto²

Marinéia L. Haddad³

Daniel R. Sosa Gómez⁴

ABSTRACT

Separation of isolates of *Metarhizium anisopliae*
(Metsch.) Sorok., with phenetic analysis

A phenetic analysis was developed to separate 11 isolates of *Metarhizium anisopliae* through 16 characters (features), using the Numerical Taxonomy Analysis (Q Technique) and the Principal Components Analysis (R Technique). The results indicated that this type of analysis constitutes a good technique to separate isolates of *M. anisopliae* to be used in the microbial control of insects. The material studied was divided into 4 groups: the largest group (7) was formed by isolates from *Mahanarva posticata* Stal, 1855 (Hom., Cercopidae), two groups from other spittlebugs and *Thyanta perditor* (Fabr., 1794) (Hem., Pentatomidae) and one group from *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hym., Formicidae).

Recebido em 14/01/86

¹ Pesquisa financiada pela FINEP e IAA/PLANALSUCAR.

² Dept^o de Entomologia da ESALQ/USP, Caixa Postal 9, 13400 Piracicaba, SP.

³ Centro de Informática na Agricultura - ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

⁴ Faculdade de Agronomia e Zootecnia de la UNT - Argentina.

INTRODUÇÃO

O fungo *M. anisopliae* vem sendo utilizado no Brasil para o controle microbiano de diversos insetos. Em cana-de-açúcar é empregado para o controle de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* onde apresenta uma eficiência de 30 a 40% segundo GUAGLIUMI et al. (1974). Em pastagens, esse patógeno é utilizado no controle de cigarrinhas dos gêneros *Deois* e *Zulia* (Hom. Cercopidae), sendo os índices de controle muito variáveis em função da dosagem/ha, qualidade do produto, raça e condições de aplicações do fungo. Também, esse patógeno ocorre naturalmente sobre *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep., Pyralidae), *Atta* spp., *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Col., Curculionidae), *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hem., Pentatomidae) e outras pragas de importância econômica no Brasil.

Por outro lado, para a produção massal deste fungo visando a sua aplicação no campo, é necessário a sua caracterização a nível de raças, já que o mesmo apresenta, naturalmente, uma grande variabilidade genética.

A caracterização de linhagens de *M. anisopliae*, tem sido realizada utilizando apenas algumas características ou qualidades dos isolados. Assim, a especificidade de isolados de *M. anisopliae* já foi estudada por diversos autores. TULLOCH (1976) considerou o tamanho dos conídios para separar a espécie *anisopliae* em duas variedades. Enzimas extracelulares foram utilizadas por DE CONTI et al. (1980) e ROSATO et al. (1981) visando a separação de isolados de *M. anisopliae*. Também técnicas de cromatografia gasosa têm sido utilizadas para caracterização de diversos microorganismos (WADE & MANDLE, 1974; BURNS et al., 1976). Recentemente esta técnica foi utilizada visando a identificação de raças de *M. anisopliae* (MESSIAS et al., 1983).

Assim, neste trabalho, empregou-se a análise fenética para esse tipo de separação, utilizando-se segundo CRISCI & ARMENGOL (1983) uma análise de agrupamento de taxonomia numérica e uma análise de ordenação de componentes principais conforme foi empregado por CUNHA (1973) para separação de meliponídeos e por MONTEIRO & CUNHA (1980) para *M. anisopliae*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Setor de Patologia de Insetos do Deptº de Entomologia da ESALQ/USP, com 11 isolados de *Metarhizium anisopliae*, de diferentes procedências que constituíram as diferentes OTU'S, a saber:

A - PL-32	G - PL-50
B - PL-35	H - PL-51
C - PL-39	I - SPL-52T
D - PL-43	J - SPL-54A
E - PL-47	K - SPL-3F
F - PL-50	

A caracterização desses isolados foi feita determinando-se 16 caracteres numerados de 1 a 16.

Caracteres:

1. Tipo de colônia: normal (1); colônia com esporulação central (2); esporulação esparsa (3).
2. Hospedeiros de origem; *M. posticata* (1); outras cigarri-nhas (2); outros insetos (3).
3. Tamanho de conídios: menor que 6,31 μ (1); 6,31 a 8,37 μ (2); maior que 8,37 μ (3).
4. Origem: Nordeste (1); Sudeste (2).
5. Número de conídios: alta produção (1); média produção (2); baixa produção (3).
6. Crescimento: igual ao Padrão (1); menor que o Padrão (2); maior que o Padrão (3), sendo considerado padrão o isolado SPL-3F.
7. Número de conídios em 10 lagartas: alto (1); médio (2); baixo (3).
8. Taxa de Potência em *Diatraea saccharalis*: igual ao Padrão (1); menor que o Padrão (2); maior que o Padrão (3).
9. Taxa de Potência em *Galleria mellonella*: igual ao Padrão (1); menor que o Padrão (2); maior que o Padrão (3).
10. Proporção de atividade (*G. m./D. s.*): igual ao Padrão (1); menor que o Padrão (2); maior que o Padrão (3).
11. Resistência a ultra violeta: resistente (1); moderadamente resistente (2); sensível (3).
12. Amilase: baixo teor (1); médio (2); alto (3).
13. Protease: baixo teor (1); médio (2); alto (3).

14. Lipase: baixo teor (1); médio (2); alto (3).
15. Zimograma (padrão eletroforético do isolado): Padrão A (1); Padrão B (2), segundo ALVES *et al.* (1983).
16. COR: Verde-387 (1); Amarelo 309 (2); Amarelo 308 (3) (2º código Universal de Cores de Séguy).

A confecção dos vetores foi baseado no cálculo do Intervalo de Confiança (IC) da média aritmética dos dados a 5%, segundo a equação:

$$IC = \bar{X} \pm t.s(\bar{X}):$$

onde, \bar{X} é a estimativa da média aritmética, $s(\bar{X})$ é o erro padrão dessa média e o t é o valor tabelado do teste t a 5% de probabilidade com $N-1$ graus de liberdade para $N = 10$ dados.

Através dessa equação trabalhou-se com vetores de múltiplo estado sendo:

Vetor 1 = valor < IC

Vetor 2 = valor = IC

Vetor 3 = valor > IC

ou vetores binários:

Vetor 1 = valor menor que a média

Vetor 2 = valor maior que a média.

O coeficiente de semelhança empregado foi o de distância euclidiana média segundo a equação:

$$d_{jk} = \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_{ij} - X_{ik})^2 \right]^{1/2}$$

Na análise de taxonomia numérica pela técnica Q (CURI, 1983) utilizou-se o algoritmo Weighted Pair Group Method - Averages (WPGMA) sendo o ajustamento feito através do Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), para o fenograma obtido.

Em seguida empregou-se como análise de ordenação a análise dos componentes principais que através da técnica R permitiu evidenciar os caracteres de maior interesse. Os cálculos foram desenvolvidos no micro-computador CP500 Prológica do Deptº de Entomologia da ESALQ/USP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matriz básica obtida para as 11 OTU'S e os 16 caracteres determinados constam do Quadro 1.

QUADRO 1 - Matriz básica para os isolados de *Metarhizum anisopliae*.

Caracteres	O T U ' S										
	PL-32	PL-35	PL-39	PL-43	PL-47	PL-48	PL-50	PL-51	SPL-52T	SPL-54A	SPL-3F
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	3	1
2	1	1	2	1	1	1	1	1	3	3	2
3	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2
4	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
5	1	2	1	2	2	2	2	2	1	3	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1
7	2	2	1	2	1	1	2	1	3	2	3
8	1	1	3	1	1	1	1	1	3	2	1
9	1	3	3	1	2	2	2	1	3	2	1
10	3	3	3	3	1	2	1	1	3	1	1
11	2	2	3	2	2	1	2	2	1	3	2
12	2	3	2	2	2	2	2	1	2	2	1
13	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
14	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3
15	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2
16	1	1	2	1	1	1	1	1	2	3	2

A metodologia sequencial empregada na análise de taxonomia numérica levou a obtenção do fenograma da figura 1 (WPGMA) com os respectivos ajustes que foi a mesma técnica empregada por CUNHA (1973) na separação de meliponíneos.

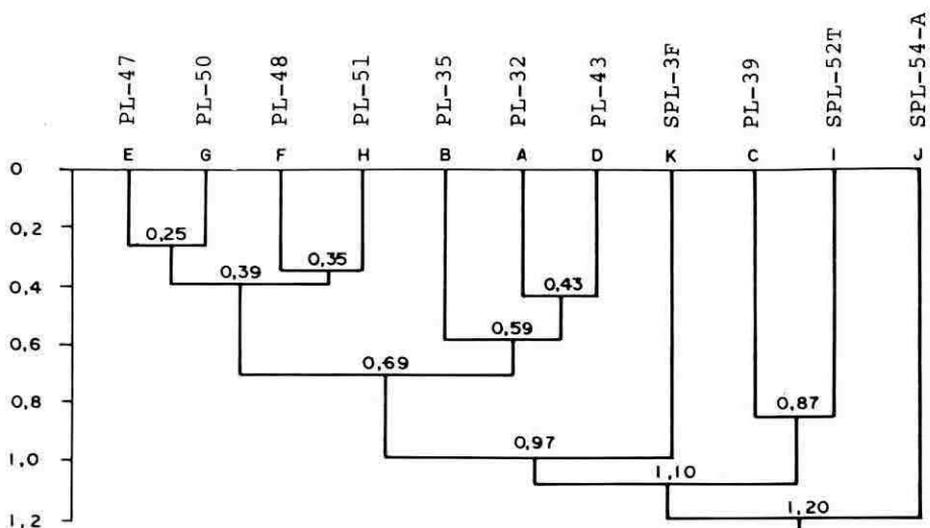


FIG. 1 - Fenograma WPGMA por distâncias euclidianas médias
 CCC = 0,941, $R^2 = 88,5\%$.

Assim ficou evidente a separação dos seguintes grupos de isolados E, G, F, H, B, A, D, constituindo um 1º Grupo, C, I um 2º Grupo, K um isolado de posição intermediária e finalmente o J, que foi o isolado mais afastado.

Para melhor evidenciar esses agrupamentos e se saber os caracteres mais representativos obteve-se pela análise dos componentes principais os valores dos Quadros 2 e 3.

Pelos dados do Quadro 2 observa-se que a explicação até o 3º eixo alcançou 75,8% o que assegurou uma boa confiabilidade à análise.

Pelos dados dos autovetores (Quadro 3) separaram-se os caracteres de maior contribuição na separação das OTU'S que foram respectivamente para o eixo X: zimograma (15) e hospedeiro de origem (2); para o eixo Y o crescimento da colônia (6) e no eixo Z a proporção de atividade (10).

A partir dos valores dos eixos ortogonais ajustados convenientemente, confeccionou-se o gráfico tridimensional da Figura 2.

QUADRO 2 - Autovalores obtidos da análise dos componentes principais em 246 rotações.

Eixos	Autovalores	% de explicação
1	5,607	35,0
2	3,579	22,3
3	2,962	18,5
4	1,768	11,1
5	1,045	6,5
6	0,559	3,5
7	0,316	2,0
8	0,097	0,6
9	0,048	0,3
10	0,018	0,1
11 a 16	0,000	0,0

QUADRO 3 - Autovetores obtidos da análise de componentes principais.

Caracteres	Autovetores		
	1	2	3
1	-0,211	+0,413	+0,086
2	+0,396	+0,158	+0,054
3	-0,271	-0,172	+0,308
4	+0,029	+0,032	+0,443
5	-0,159	+0,402	+0,198
6	+0,127	+0,479	+0,114
7	+0,245	-0,146	+0,135
8	+0,347	+0,062	-0,236
9	+0,177	+0,041	-0,238
10	+0,059	-0,162	-0,489
11	+0,048	+0,354	-0,118
12	-0,057	+0,107	-0,345
13	-0,278	+0,190	-0,303
14	+0,309	-0,281	+0,216
15	+0,405	+0,078	+0,033
16	+0,353	+0,268	+0,075

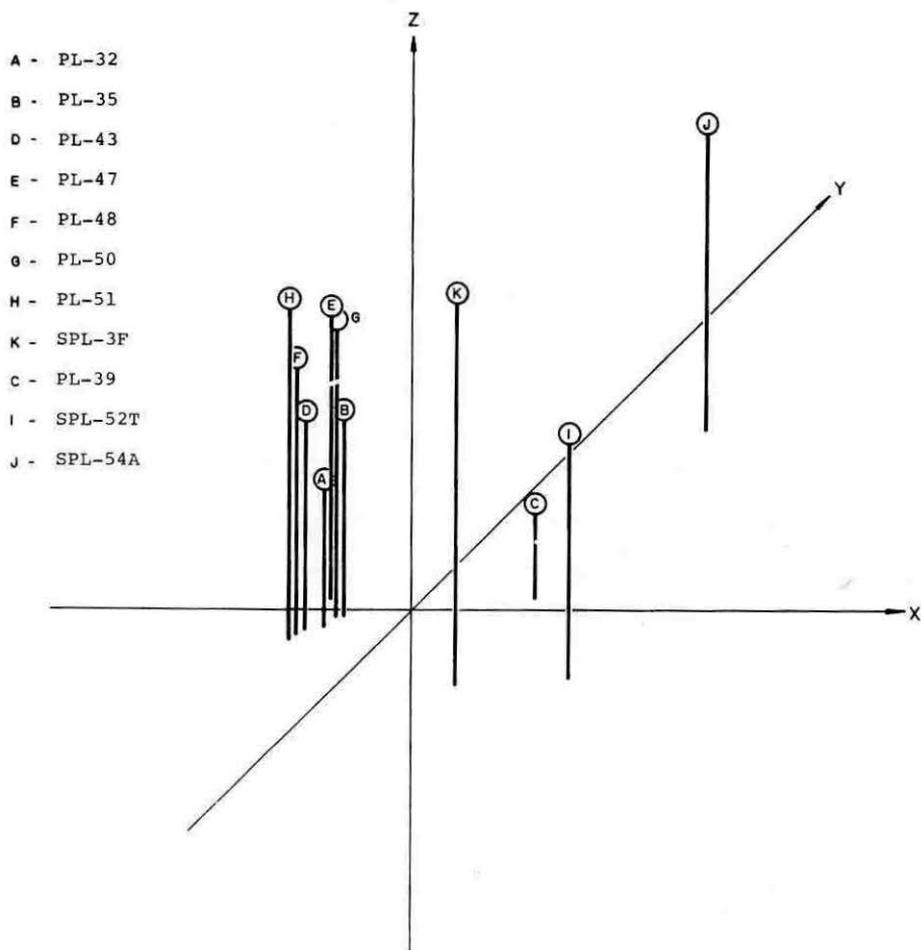


FIG. 2 - Análise de componentes principais.

Dessa forma, os resultados da Figura 2 vem reforçar o que já havia sido obtido na Figura 1, quanto aos agrupamentos de isolados ou seja:

- GRUPO A - os isolados PL-32, PL-35, PL-43, PL-47, PL-48, PL-50, PL-51, todos provenientes da cigarrinha *M. posticata*, o que poderia supor, inclusive, a existência de uma variedade de *Metarhizium* associada a esta cigarrinha, *M. anisopliae* var. *posticata*, já que isolados com as características desse grupo ocorrem em 97% das amostras de *M. posticata* atacadas pelo fungo (ALVES, 1983).
- GRUPO B - isolado PL-39 proveniente da cigarrinha *M. fimbriolata* e isolado SPL-52T do percevejo *T. perditor*.
- GRUPO C - isolado SPL-3F, proveniente da cigarrinha *D. flavopieta*.
- GRUPO D - isolado SPL-54-A, de formiga saúva *A. sexdens rubropilosa*.

Estes resultados demonstraram uma grande variabilidade natural entre os diferentes grupos de isolados e comprovam de certa forma os resultados de MONTEIRO & CUNHA (1980), e deixa claro que o hospedeiro de origem é fundamental no agrupamento de isolados desse fungo.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode ser concluído que a análise fenética se constituiu em uma boa técnica para separação dos isolados de *M. anisopliae*, visando a sua utilização em programas de controle microbiano de insetos.

O material estudado está dividido em 4 grupos de isolados dos quais o maior é constituído por isolados de *M. posticata*, 2 grupos de outras cigarrinhas e *T. perditor* e um grupo proveniente de *A. sexdens rubropilosa*.

LITERATURA CITADA

- ALVES, S.B.; MACHADO NETO, R.; MACEDO, N.; ALMEIDA, L.C. Widespread occurrence of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (STANDARD A) on *Mahanarva posticata* (Stal) in Brazil. *Entomol. Newsl.* 15: 6-8, 1983.

- BURNS, D.T.; STRETTON, R.J.; JAYATILAKE, S.D.A.K. Pyrolysis gas chromatography as an aid to identification of *Penicillium* species. *J. Chromatogr.* 116: 107-115, 1976.
- CRISCI, J.V. & ARMENGOL, M.F.L. Introduction a la teoria y practica de la taxonomia numérica. Washington D.C. Secretaria General de la Organizacion de los Estados Americanos, 1983. 132p.
- CUNHA, R.A. Taxonomia numérica de alguns meliponinae (Hym., Apidae). *Ciênc. Biol.* (Portugal) 1: 25-42, 1973.
- CURI, P.R. Análise de agrupamentos: métodos especiais aglomerativos e hierárquicos. *Ciênc. Cult.* 35(10): 1416-1429, 1983.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; DE SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterases and phosphatase in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, 36: 293-294, 1980.
- GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E.J.; VILAS BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., no controle da cigarrinha da folha no Nordeste do Brasil. CODECAP. 1974. 54p. (Boletim nº 3).
- MESSIAS, C.L.; ROBERTS, D.W.; GREFIG, A.T. Pyrolysis-gas Chromatography of the Fungus *Metarhizium anisopliae*: An Aid Strain Identification. *J. Invertebr. Pathol.* 42: 393-396, 1983.
- MONTEIRO, R.T.R. & CUNHA, R.A. Um estudo fenético de linha gens de *Metarhizium*. *Ciênc. Cult.* (Suplemento), 32(7):682, 1980.
- ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Production of Extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 38(1): 1-3, 1981.
- TULLOCH, N. The genus *Metarhizium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66: 407-411, 1976.
- WADE, T.J. & MANDLE, R.J. New gas chromatographic characterization procedure. Preliminary studies on some *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 27: 303-311, 1974.

RESUMO

Neste trabalho, desenvolveu-se uma análise fenética para separação de 11 isolados de *Metarhizium anisopliae* através

de 16 caracteres usando-se a análise de Taxonomia Numérica (Técnica Q) e a análise de ordenação de componentes principais (Técnica R).

De acordo com os resultados concluiu-se que este tipo de análise se constitui em boa técnica para separação de isolados de *M. anisopliae* visando a sua utilização no controle microbiano de insetos.

O material estudado foi dividido em 4 grupos sendo o maior (7) constituído por isolados de *Mahanarva posticata*, 2 grupos de outras cigarrinhas e *Thyanta perditor* e um grupo proveniente de *Atta sexdens rubropilosa*.