

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E GESTÃO**  
**VITIVINÍCOLA**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA E GESTÃO VITIVINÍCOLA**

**Ana Carolina Ruiz**

**VIRULÊNCIA DE *Nomuraea rileyi* À *Spodoptera frugiperda* E PERFIL PROTÉICO DO  
SECRETOMA EM PRESENÇA DA CUTÍCULA DO INSETO**

CAXIAS DO SUL

2016

**Ana Carolina Ruiz**

**VIRULÊNCIA DE *Nomuraea rileyi* À *Spodoptera frugiperda* E PERFIL PROTÉICO DO  
SECRETOMA EM PRESENÇA DA CUTÍCULA DO INSETO**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre, pelo  
Mestrado Profissional em Biotecnologia e  
Gestão Vitivinícola

Orientadora Profa. Dra. Neiva Monteiro de  
Barros

**Caxias do Sul**

**2016**

R934v Ruiz, Ana Carolina

Virulência de *Nomuraea rileyi* à *Spodoptera frugiperda* e Perfil  
Protéico do Secretoma em Presença da Cutícula do Inseto / Ana  
Carolina Ruiz. – 2016.  
38 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Orientação: Neiva Monteiro Barros.

Coorientação: Lúcia Rosane Bertholdo Vargas.

1. *Nomuraea rileyi*. 2. *Spodoptera frugiperda*. 3. Fungos  
entomopatogênicos. 4. Proteômica. I. Barros, Neiva Monteiro, orient.  
II. Bertholdo Vargas, Lúcia Rosane, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados  
fornecidos pelo(a) autor(a).

ANA CAROLINA RUIZ

**VIRULÊNCIA DE *Nomuraea rileyi* À *Spodoptera frugiperda* E PERFIL PROTÉICO DO SECRETOMA EM PRESENÇA DA CUTÍCULA DO INSETO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão Vitivinícola da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestra em Biotecnologia e Gestão Vitivinícola.

Orientadora: Dra. Neiva Monteiro de Barros

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07 DE NOVEMBRO DE 2016.

---

Dra. Neiva Monteiro de Barros  
Orientadora

---

Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

---

Dr. Gabriel Fernandes Pauletti

---

Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Aos meus pais Edevilson e Ana Maria (in memoriam), meus primeiros e preciosos educadores, ao meu irmão Alexandre pelo carinho e apoio e ao João Pedro pelo amor e força.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por sempre estar presente mostrando que tudo vale a pena quando nos dedicamos ao que fazemos e realizamos tudo com amor, e por ter colocado pessoas maravilhosas na minha trajetória.

À minha mãe por tudo que ensinou no seu curto período de vida (você esta entre nós).

Ao meu pai que com carinho de pai e mãe, vive para os filhos, foi meu alicerce em vários momentos de desespero e angústia, que com o seu amor me ergueu e mostrou que os problemas seriam resolvidos.

Ao meu irmão que é a minha fortaleza, pela cumplicidade de vida, por compartilharmos tudo que temos, pelo apoio incondicional, e por sempre acreditar em mim, abrindo meus olhos e mostrando o caminho certo sempre.

À minha família a qual posso amar e ser fortalecida na reciprocidade do mesmo amor, por ser sempre tão incentivadora e entender a minha ausência por tantos anos.

À minha orientadora Dra. Neiva Monteiro de Barros, pelo apoio pessoal, conceitos, lições, abrindo as portas do seu laboratório e com muita paciência me aceitou como sua orientada, mostrando que acreditava em mim como profissional e como pessoa.

À minha co-orientadora Dra. Lúcia Vargas não apenas pela valiosa orientação, mas pelo conhecimento científico, amizade, respeito, presença constante em todos os anos de convivência, contribuindo para realizar meu sonho, tornou-se minha amiga e um exemplo a ser seguido. Meus agradecimentos vão muito além da sua orientação.

Aos colegas do laboratório Controle de Pragas, em especial à Geórgia, pela amizade e ajuda nos testes e ao Aaron pela ajuda nas análises estatísticas aplicadas nesse estudo.

À Rosângela Festugatto pela amizade e companheirismo, à Marielsa Secco pelo carinho nessa reta final, pelos almoços de domingo e colo de mãe.

À Roseli da Silva Richter pela generosidade em ceder vários dias de trabalho, por aceitar e nunca reclamar da minha ausência na farmácia. Obrigada por tudo, principalmente por estender a mão sempre que precisei. Serei eternamente grata.

Obrigada à todos aqueles que acreditaram na realização deste trabalho, pela amizade e contribuição na minha formação pessoal e profissional.

“Eu tentei 99 vezes e falhei. Mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista de seus objetivos, mesmo que eles pareçam impossíveis. A próxima tentativa pode ser a vitoriosa. ”

(Albert Einstein)

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Insetos-pragas.....	14
2.2. Controle de Pragas.....	15
2.3. <i>Nomuraearileyi</i> : fatores associados à virulência.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivo Específico.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Insetos.....	21
4.2. Linhagens do fungo <i>N. rileyi</i> .....	21
4.3. Avaliação da virulência de <i>N. rileyi</i> à <i>S. frugiperda</i> .....	21
4.4. Análise do Secretoma.....	22
4.5. Quantificação de proteínas dos extratos extracelulares.....	22
4.6. Preparação da amostra para SDS-PAGE.....	22
4.7. Análise por <i>SDS-PAGE</i> das proteínas secretadas.....	23
4.8. Coloração dos géis.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Virulência das linhagens UCS03 e Sa86101 do fungo <i>N. rileyi</i> sobre <i>S. frugiperda</i> .....	24
5.2. Proteínas totais secretadas pelo fungo.....	26
5.3. Análise das proteínas secretadas.....	27
6. CONCLUSÕES.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de mortalidade de <i>S. frugiperda</i> em ensaios com as linhagens Sa86101 e UCS03, Caxias do Sul, 2016.....	24
Figura 2. Porcentagem de mortalidade de <i>S. frugiperda</i> com a linhagem UCS03, Caxias do Sul, 2016.....	26
Figura 3. Proteínas totais secretadas pela linhagem UCS03 em função do tempo, em meio suplementado com cutícula de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	27
Figura 4. Perfil eletroforético do sobrenadante: (M) Marcador de massa molecular (Benchmark) (A) Controle com cutícula de <i>S. frugiperda</i> (B) Controle com <i>N. rileyi</i> , (C) Amostra coletada em 13 dias, (D) Amostra coletada em 14 dias, (E) Amostra coletada em 14 dias, (F) Amostra coletada em 15 dias e (G) Amostra coletada em 16 dias.....	28

## RESUMO

A viticultura é uma atividade de grande importância econômica, destacando-se a sustentabilidade da pequena propriedade e o desenvolvimento territorial associados às atividades ligadas ao turismo. As plantas cultivadas se tornam vulneráveis a patógenos e insetos-praga e a videira apresenta diversas espécies consideradas pragas que reduzem sua produção e rentabilidade, entre estas, *Spodoptera frugiperda*, causando danos em diferentes partes da planta. Fungos entomopatogênicos podem oferecer uma alternativa aos pesticidas convencionais para o controle de pragas, pois produzem enzimas que degradam o exoesqueleto do inseto como quitinases e proteases facilitando o modo de infecção. Neste trabalho foi avaliado o potencial inseticida do fungo *Nomurea rileyi*, linhagem UCS03, contra *S. frugiperda* e o perfil eletroforético por SDS-PAGE das proteínas secretadas por *N. rileyi* em presença da cutícula do inseto em diferentes intervalos de tempo em gel unidimensional. O fungo *N. rileyi* apresentou virulência contra *S. frugiperda*, determinando um  $CL_{50}$  de  $2 \times 10^9$  conídios/mL com a linhagem UCS03 demonstrando atividade bionseticida. Na avaliação do perfil proteico do secretoma de *N. rileyi* em presença da cutícula do inseto, em diferentes tempos de cultivo, foi possível verificar um perfil altamente diferenciado. A maior concentração de proteína foi encontrada no 14º dia de incubação (0,3507 mg/mL) reduzindo a quantidade de proteínas após este período. Na análise por SDS-PAGE foi possível verificar diferentes proteínas de diferentes massas moleculares, nos intervalos de tempo considerados, sendo muitas inferiores a 75 kDa. Estas proteínas com diferentes massas moleculares podem estar envolvidas no metabolismo do fungo. Desta forma, estes resultados podem contribuir para a compreensão do processo de infecção de *N. rileyi* em *S. frugiperda*, oferecendo potencial para o desenvolvimento de novas pesquisas e aplicações destas em processos biotecnológicos.

## ABSTRACT

Viticulture is an activity of great economic importance with emphasis on the sustainability of small property and territorial development associated with tourism related activities. Cultivated plants become vulnerable to pathogens and insect pests and the vine has several species considered as pests that reduce their production and profitability, among them, *Spodoptera frugiperda*, with causes damage in different parts of the plant. Entomopathogenic fungi can provide an alternative to conventional pesticides for controlling pests, they produce enzymes that degrade the insect exoskeleton, such as chitinases and proteases facilitating the infection. In this work, the insecticide potential of the fungus *Nomurea rileyi* and *S. frugiperda* was evaluated, as well as the proteins secreted by *N. rileyi* in the presence of insect cuticle at different time intervals in one-dimensional gel. The fungus *N. rileyi* presented virulence against *S. frugiperda*, determining a  $CL_{50}$  of  $2 \times 10^9$  con / mL with UCS03 strain demonstrating bioinsecticidal activity. In assessing the protein profile of secretome *N. rileyi* in the presence of insect cuticle, at different times of cultivation, a highly differentiated profile was verified. The highest concentration of protein was found at day 14 of incubation (0.3507 mg / ml) reducing the amount of protein after this period. In the one-dimensional gel analysis was verified different molecular weights of proteins, in the time interval considered being many less than 75kDa. These proteins with different molecular weights may be involved in fungal metabolism. Thus, these results can contribute to the understanding of the infection process of *N. rileyi* in *S. frugiperda*, offering potential for the development of new researches and applications in biotechnological processes.

## INTRODUÇÃO

A videira pertencente à família *Vitaceae*, gênero *Vitis*, é uma das mais antigas plantas cultivadas pelo homem. Em nível mundial, a viticultura é uma atividade de grande importância econômica, destacando-se a sustentabilidade da pequena propriedade e o desenvolvimento territorial associado às atividades ligadas ao turismo.

A viticultura brasileira ocupa uma área plantada de 81 mil hectares, sendo a uva cultivada em diferentes regiões brasileiras, porém concentra-se principalmente na região Sul com o Rio Grande do Sul destacando-se por ser a maior região vitícola do país, contribuindo com 777 milhões de quilos de uva por ano onde são elaborados, em média anual, 330 milhões de litros de vinhos e mostos (sumo de uvas frescas que ainda não tenham passado pelo processo de fermentação) (MAPA, 2013).

A agricultura moderna é caracterizada pela monocultura, onde as plantas cultivadas se tornam vulneráveis a patógenos e insetos-praga, que se disseminam facilmente de um campo para o outro. A cultura da videira apresenta diversas espécies consideradas pragas que reduzem sua produção e rentabilidade, entre estas, *Spodoptera frugiperda*, considerada praga secundária desta cultura, causando danos em diferentes partes da planta.

O uso de organismos vivos como agentes de controle de pragas é uma importante alternativa à utilização de pesticidas químicos, evitando os indesejáveis problemas ambientais e de saúde pública. O controle biológico de pragas assume cada vez mais importância em programas de manejo de pragas, principalmente para uma agricultura com menos impacto ecológico.

Diversos estudos têm demonstrado que os fungos entomopatogênicos são capazes de causar doenças em insetos e ácaros. Entre estes, destaca-se o fungo entomopatogênico *Nomurea rileyi*, o qual pode ser utilizado como um inseticida biológico para o controle de insetos das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera em diversas culturas.

Os fungos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, o que é uma característica desejável. A maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que infectam o inseto por via oral. No processo de penetração do fungo no inseto, além do processo físico estão envolvidos processos químicos, resultantes da produção e secreção de enzimas, as quais facilitam a penetração mecânica do fungo. Algumas enzimas podem estar correlacionadas com a agressividade de certos fungos para determinados hospedeiros, porém a morte do inseto é ocasionada por uma série complexa de eventos.

Para a implementação de programas de controle biológico é de extrema importância o conhecimento dos fatores envolvidos no processo de virulência dos fungos entomopatogênicos entre insetos-praga. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a virulência do fungo *N. rileyi* sobre *S. frugiperda* e a produção de proteínas extracelulares em meio suplementado com cutícula do inseto em diferentes intervalos de tempo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Insetos-pragas

Praga agrícola compreende uma população de organismos capazes de causar danos às plantas, seus produtos e subprodutos. O dano pode afetar o rendimento do produto ou sua qualidade, através do consumo direto dos tecidos ou órgãos da planta, frutos ou sementes, sucção de seiva, transmissão de doenças, competição por espaço e por nutrientes.

Mesmo em condições satisfatórias de clima e qualidade de solo, problemas como doenças, plantas invasoras e insetos-praga interferem na produtividade e qualidade da safra (Embrapa, 2007).

A ocorrência de insetos-praga pode afetar significativamente o potencial produtivo das plantas. É possível encontrar em alguma região ou determinado ano agrícola, a presença de pragas que têm a capacidade de reduzir o número ideal de plantas, seja por danificar e matar a semente logo após o plantio, ou a plântula antes ou após a emergência. A planta também pode ser morta pelo efeito sinérgico do ataque dos insetos-praga e pela competição com outros fatores, doenças ou estresses abióticos como escassez de água, por exemplo. Em função da espécie do inseto e da época de ataque pode não ocorrer a morte da planta, e sim uma redução parcial de sua capacidade de produção (Embrapa, 2006).

A cultura da videira está sujeita ao ataque de insetos-praga durante todo o ciclo já tendo sido relatadas aproximadamente 160 espécies de insetos que se alimentam da planta. Os danos causados pelos insetos às plantas podem ocasionar maior ou menor prejuízo quantitativo e qualitativo, dependendo de variáveis como espécie, densidade populacional, estágio de desenvolvimento, estrutura vegetal atacada e duração do ataque (Bento, 1999; Gallo *et al.*, 2002).

A maioria dos danos atribuída aos lepidópteros é ocasionada pelas lagartas, devido ao seu hábito alimentar fitófago. Em determinadas regiões, dependendo da localização e manejo do parreiral, tem sido observados danos nas folhas e nos ramos ocasionados por *Spodoptera frugiperda* (Efrom *et al.*, 2014).

No Brasil, esta espécie de inseto era considerada praga secundária em diversos cultivos, incluindo espécies anuais e perenes (Fonseca, 2006; Quintela *et al.*, 2007), mas relatada como praga primária em diferentes culturas (Miranda *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010, Botton *et al.*, 2012)

Dentre os insetos que causam danos econômicos, *Spodoptera frugiperda* é comumente conhecida no Brasil como lagarta-do-cartucho, lagarta-dos-milharais e lagarta-militar, considerada uma praga secundária da cultura da videira. É um inseto altamente polífago e cosmopolita, estando amplamente distribuído pelas regiões produtoras devido à grande disponibilidade e diversidade de alimento (Cruz, 1995), além de adaptar-se facilmente a diferentes latitudes e longitudes e possuir excelente fecundidade (Labrador, 1967).

*S. frugiperda* pode atacar diferentes culturas em qualquer época do ano, a frequência e a intensidade de uso de inseticidas têm aumentado bastante nos últimos anos e fracassos no controle de *S. frugiperda* com inseticidas tradicionais têm sido periodicamente relatados (Diez-Rodríguez & Omoto, 2001)

## **2.2. Controle de Pragas**

Desde a antiguidade, agricultores tentam desenvolver maneiras alternativas de controle das pragas que se difundem nos cultivos, competindo pelo alimento.

Desde 2008 o Brasil se tornou o maior consumidor mundial de agrotóxicos (Sindag, 2008), movimentando 6,62 bilhões de dólares em 2008, para um consumo de 725,6 mil toneladas de agrotóxicos – o que representaria 3,7 quilos de agrotóxicos por habitante.

O acúmulo de pesticidas no solo normalmente atinge o lençol freático, difundindo-se para locais ao redor da área de aplicação, contaminando outras plantas, animais e humanos (Akbar & Akbar, 2013). A contaminação por pesticidas é associada com inúmeras consequências, como danos ao sistema nervoso e aumento na probabilidade de desenvolvimento de câncer (Soares, 2010). Neste sentido, foram notificados no Brasil 1.055.897 casos de intoxicações humanas por agrotóxicos e 6.632 óbitos pelo mesmo motivo no período entre 1989 e 2004 (Sinitox, 2004).

Uma forma de minimizar os impactos decorrentes do uso de inseticidas químicos é o emprego do controle biológico. De acordo com Eilenberg *et al.*, (2006), o controle biológico envolve o uso de organismos vivos para controlar a densidade populacional e/ou o impacto de um organismo patogênico específico. É uma alternativa vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, à especificidade, ao desenvolvimento de resistência e o impacto sobre a saúde humana (Lopes, 2009; Franceschini *et al.*, 2001).

O controle biológico assume importância cada vez maior, primeiramente por ser um dos pilares de sustentação de qualquer programa e, em segundo lugar como uma importante

medida de controle para manutenção das pragas em níveis populacionais toleráveis (Parra, 2000).

Ao lado de tantos outros métodos de controle, como culturais, físicos, de resistência de plantas a insetos, comportamentais (feromônios), podem ser harmoniosamente integrados com métodos químicos (especialmente reguladores de crescimento e produtos de última geração, pouco agressivos ao meio ambiente) (Parra, 2000).

O uso generalizado e contínuo de inseticidas químicos para o controle de pragas agrícolas, além de ocasionar problemas ambientais pode conduzir ao desenvolvimento de resistência por parte dos insetos alvo. Devido ao aumento da resistência dos insetos-praga aos inseticidas químicos, os fungos entomopatogênicos tem sido usados como uma alternativa ao controle de tais pragas (Shah & Pell, 2003).

Os fungos possuem fatores de virulência para a penetração da cutícula dos insetos, conferindo vantagem sobre outros patógenos que infectam os insetos por via oral ou mesentério, como bactérias e vírus. A capacidade do fungo infectar o inseto hospedeiro depende não somente da suscetibilidade do hospedeiro e condições ambientais, mas também da produção de fatores de virulência pelo fungo.

Enzimas tomam um papel importante no processo de penetração, especialmente durante as fases de adesão e germinação dos conídios. Um complexo multienzimático contendo quitinases, proteases e lipases é necessário para a degradação da cutícula dos insetos (Schrank & Vainstein 2010; Ortiz-Urquiza & Keyhani 2013)

Alguns fungos podem manter-se em populações de insetos suscetíveis por muitas gerações sem necessitarem de aplicações repetidas. Uma vez que a maioria das espécies de fungos não necessita ser ingerida para causar infecção, os mesmos podem ser usados para controlar populações de insetos em estágios em que estes não se alimentam, como na pupação e, muitas vezes antes que tenham ocasionado danos econômicos.

*Nomurea rileyi* pode infectar muitas pragas das principais culturas em todo o mundo, especialmente lepidopteros tais como *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *Tricoplusiani*, *Anticarsia gemmatalis*, e *Pseudoplusia sp.*, com potencial para o desenvolvimento de micoinseticidas (Shanthakumar *et al.*, 2010; Thakre *et al.*, 2011).

O entendimento do processo de infecção é fundamental, a fim de acelerar a velocidade de morte do hospedeiro através de estratégias biotecnológicas, como a introdução de genes específicos, tanto do próprio fungo com promotores constitutivos (St. Leger *et al.*, 1996; Screen *et al.*, 2001), identificação e purificação de muitas enzimas possivelmente envolvidas



na virulência e indução por cutículas de insetos (St. Leger *et al.*, 1986) e estudos de proteômica (Murad *et al.*, 2008; Bianco & Perrota, 2015) que contribuem para a compreensão do modo de infecção de fungos entomopatogênicos.

### 2.3 *Nomuraearileyi*: fatores associados à virulência

O gênero *Nomurea* se caracteriza por possuir conidióforos com filíades originadas num mesmo ponto, apresentando conídios elipsóides. *Nomurea rileyi* foi reclassificado como *Metarhizium rileyi* (Kepler *et al.*, 2014)

O ciclo completo de infecção *N. rileyi* é de 8 a 12 dias a 25°C. A germinação pode ocorrer em 12 horas e a invasão da hemocele em 24 horas. O fungo penetra no inseto, frequentemente via tegumento, envolvendo dois processos principais: o físico, devido à pressão da hifa terminal que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas, e o químico, resultante da secreção de enzimas (proteases, quitinases e lipases), as quais facilitam a penetração mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo. A colonização do hospedeiro dura cerca de 3 a 5 dias e a morte pode ocorrer entre 6 a 7 dias. Os conidióforos se formam após 8 a 12 dias do início da infecção (Alves, 1998).

O fungo *N. rileyi* ocorre naturalmente infectando insetos-praga das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera em diversas culturas de importância econômica em várias regiões do mundo. Apesar de ser isolado de diversos hospedeiros descreve-se uma preferência por hospedeiros da ordem Lepidoptera (Suwannakut *et al.*, 2005).

Na Argentina, Brasil e Uruguai tem sido reportado que *N. rileyi* infecta além de larvas de *A. gemmatilis*, mais de 30 diferentes espécies de lepidópteros- praga (El-Sayed *et al.*, 1991; Devi *et al.*, 2003, Srisukchayakul *et al.*, 2005) incluindo *S. frugiperda* (Pavone *et al.*, 2009).

O primeiro registro da ocorrência do fungo *N. rileyi* infectando lagartas de *Aucula magnifica* (Lepidoptera: Noctuidae: Agaristinae) foi realizado por Poletto *et al.*, (2010 ) em *Vitis vinifera*, na cidade de Bento Gonçalves/RS. O fungo foi isolado (linhagem UCS03) e mantido na coleção de fungos entomopatogênicos do Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Grandes esforços têm sido feitos para entender os fatores determinantes da virulência em fungos entomopatogênicos (Casadevall, 2007). O modo de infecção dos fungos é preferencialmente por penetração na cutícula do hospedeiro, vencendo as barreiras físicas e

químicas da cutícula do inseto (Srisukchayakul *et al.*, 2005; StLeger & Wang 2010; Wang & Feng 2014).

Vários fatores podem estar associados à virulência do fungo nas interações com diferentes hospedeiros (Van de Wouw & Howlett, 2011; Urban *et al.*, 2015). Neste sentido, proteases e quitinases são cruciais para o fungo entomopatogênico degradar a cutícula dos insetos (Ortiz-Urquiza & Keyhani 2013; Wang & Feng, 2014).

No geral, os patógenos que infectam o mesmo grupo de hospedeiros têm características semelhantes no que diz respeito as família de proteínas secretadas, uma indicação clara de evolução convergente (Shang *et al.*, 2016).

Além das enzimas, a contribuição de metabólitos secundários para a virulência tem sido evidenciada em diferentes fungos, como por exemplo, as toxinas destruxinas e oosporeina em patógenos de insetos (Wang *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2015).

Estudos com isolados generalistas dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, comumente usados como pesticidas biológicos, mostram que os fungos empregam conjuntos diferentes de metabólitos secundários durante o crescimento infeccioso e saprofítico (Bekker *et al.*, 2013). Estudos com proteases produzidas por fungos entomopatogênicos envolvidas na degradação das proteínas da cutícula para facilitar a penetração pelas hifas do fungo foram realizados por vários autores (Tiago & Furlaneto, 2003; Campos *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2010; Dhar & Kaur, 2010; Golo *et al.*, 2015). Evidências de adsorção diferencial e degradação de proteínas ácidas ou básicas foi mostrado por eletroforese em gel bidimensional na degradação do exoesqueleto do gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* por proteinases produzidas pelos fungos entomopatogênicos *B. bassianae* e *M. anisopliae* (Bidochka & Khachatourians, 1994).

Linhagens de *Metarhizium anisopliae* de diversas origens geográficas tem sido caracterizadas de acordo com sua virulência e produção de enzimas hidrolíticas secretadas envolvidas na infecção de insetos. Entre estas, proteases, redutases e acetiltransferase podem estar envolvidas na degradação e absorção de nutrientes da cutícula desidratada de *Callosobruchus maculatus* (Murad *et al.*, 2008).

A alta diversidade de proteínas encontradas nos proteomas de fungos filamentosos pode estar associada a aparição de múltiplas modificações pós traducionais, como glicosilação, fosforilação, sulfonação, acetilação e metilação, *splicing* alternativo, entre outras, que são extremamente importantes porque determinam a função, estabilidade e localização das proteínas (Kim *et al.*, 2007).

O proteoma, de acordo com Greenbaum *et al.* (2001) abrange todas as proteínas de uma célula, tecido ou organismo, que são codificadas pelo genoma em uma determinada condição e o secretoma se refere à conjunto de proteínas secretadas por um organismo.

As proteínas secretadas por fungos têm atraído a atenção dos pesquisadores. Estes "secretomas" são uma fonte rica de enzimas degradativas. Secretomas são especialmente ricos em proteases e carboidratos e lignina hidrolases com potencial de uso comercial e industrial e proteínas cuja presença é necessária para iniciar a infecção, sendo que sua remoção pode resultar na perda da virulência dos patógenos (Rampitsch & Day, 2013).

Avanços na análise de proteínas têm auxiliado os estudos sobre secretomas de fungos filamentosos, principalmente porque eles podem elucidar vias de secreção, bem como genes para deleção ou co-expressão, para melhorar linhagens para fins biotecnológicos (Ribeiro *et al.*, 2012).

Proteínas de *Metarhizium anisopliae* relacionadas ao processo de infecção de *Dysdercus peruvianus* foram avaliadas por análise proteômica, verificando-se alterações na abundância de 71 proteínas após exposição à cutícula do hospedeiro incluindo Pr1A, B, C, I, proteínas relacionadas à danos oxidativos e proteínas sinalizadoras (Beys-da-Silva *et al.*, 2014)O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* é especializado para a secreção de um complexo enzimático consistindo de proteases, lipases e quitinases relacionadas à patogenicidade e virulência. O secretoma de duas linhagens deste fungo crescido em presença de crisálida de *Bombyx mori* como indutor foi analisado em gel bidimensional mostrando diferenças qualitativas e quantitativas entre as proteínas secretadas por ambas as linhagens. Setenta e seis por cento das proteínas correspondentes identificadas por espectrometria de massas foram agrupadas em diferentes classes (hidrolases, oxidases, redutases, isomerases, quinases, domínios de WSC, e proteínas hipotéticas), sendo trinta e três por cento comuns entre as linhagens (Rustiguel *et al.*, 2016).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a virulência do fungo *N. rileyi* sobre *S. frugiperda* e a produção de proteínas extracelulares em meio suplementado com a cutícula do inseto em diferentes intervalos de tempo.

#### **3.2 Objetivo Específico**

- Determinar a virulência do fungo *N. rileyi* à *S. frugiperda*.
- Quantificar as proteínas totais produzidas pelo *N. rileyi* em presença da cutícula de *S. frugiperda* em diferentes intervalos de tempos;
- Avaliar a indução da secreção de proteínas produzidas pelo *N. rileyi* em presença da cutícula de *S. frugiperda* em diferentes intervalos de tempos;
- Analisar por SDS-PAGE secreções de *N. rileyi* obtidas após indução pela presença da cutícula de *S. frugiperda*;

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Insetos**

As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas nos ensaios foram provenientes da criação de insetos mantida no laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Estes lepidópteros foram mantidos em sala climatizada com temperatura de  $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa (UR) de 60% e fotofase de 14 horas. A alimentação das lagartas constou de dieta artificial preparada segundo Greene *et al.* (1976).

Para os ensaios do secretoma foram utilizadas cutículas de *S. frugiperda* de 5° a 6° ínstar, secas em estufas a  $50^{\circ}\text{C}$  por cerca de 4 horas.

### **4.2 Linhagens do fungo *N. rileyi***

Duas linhagens do fungo *N. rileyi* foram selecionadas para os ensaios: linhagem UCS03, isolada de *Aucula magnifica*, coletada em *Vitis vinifera*, na cidade de Bento Gonçalves (RS) e a linhagem Sa86101, isolada de *A. gemmatalis*, na cidade de Sarandi (RS), ambas armazenadas no Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle de Pragas da Universidade de Caxias do Sul.

### **4.3 Avaliação da virulência de *N. rileyi* à *S. frugiperda***

Sa86101 do fungo foram realizados por meio de tratamento em placa de Petri contendo papel filtro previamente esterilizado. As suspensões de conídios foram distribuídas sobre o papel filtro nas concentrações de  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^9$  conídios/mL.

Foram utilizadas 150 lagartas para cada concentração, considerando-se 50 insetos por repetição e igual número para o controle, por um período de 24 horas, com 60% UR e  $26^{\circ}\text{C}$ . Após este período, os insetos foram transferidos para dieta artificial e mantidos nas mesmas condições da sala de criação. A taxa de mortalidade foi avaliada diariamente até o estágio de pupa. Os dados de mortalidade dos insetos foram submetidos à análise de Probit pelo programa estatístico Statgraphics XVII, determinando-se o  $CL_{50}$  (concentração letal mediana) e  $TL_{50}$  (tempo letal mediano).

#### **4.4 Análise do Secretoma**

A análise do secretoma foi realizada com a linhagem UCS03 do fungo *N. rileyi*, inoculando-se 1 mL de uma suspensão de  $10^9$  con/mL em *Erlenmeyers* contendo meio TM autoclavado (0,1% bacto-peptona, 0,03% uréia, 0,2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,4 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,03%  $\text{MgSO}_4$ , 0,3% glicose), mantidos por 3 dias sob agitação a 26°C. Após o período de incubação em meio TM, os micélios foram lavados e transferidos para novos *Erlenmeyers*, contendo meio mínimo (MM) autoclavado (0,2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,03%  $\text{MgSO}_4$ , 1,4 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) – controle e meio mínimo adicionado de 0,5% de cutícula desidratada de *S. frugiperda* (lagartas de 5° ou 6° ínstar, secas em estufa a 50°C por cerca de 8 horas e maceradas em almofariz) também previamente autoclavados. Em diferentes intervalos de tempos foram coletadas amostras e armazenadas.

#### **4.5 Quantificação de proteínas dos extratos extracelulares**

A quantificação de proteínas do secretoma foi realizada pelo método de Bradford (1976), da seguinte forma: 1,0 mL de reagente de Bradford (100 mg de *Coomassie brilliant blue* R-250, 50 mL de etanol a 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85%) foi pipetado em 100  $\mu\text{L}$  de amostra, utilizando-se 100  $\mu\text{L}$  de água destilada para controle negativo. A solução foi agitada e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida as amostras foram analisadas por espectrofotometria a 595nm, utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

#### **4.6 Preparação da amostra para SDS-PAGE**

As proteínas dos sobrenadantes das culturas foram precipitadas utilizando-se acetona para análise em SDS-PAGE. Para volume de amostra, correspondente a quantidade de proteína requerida foi adicionado acetona numa proporção de 1:2 (v/v), seguida de incubação a 4°C por 20 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 min com temperatura de 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo as proteínas, foi lavado 2 vezes com água destilada, por centrifugação, a 13.000 rpm por 15 min com temperatura de 4°C. Após o descarte da água o sedimento protéico foi liofilizado e ressuspendido em 30  $\mu\text{L}$  de tampão amostra.

#### **4.7 Análise por SDS-PAGE das proteínas secretadas**

As proteínas foram preparadas, segundo o item 3.5. As análises foram feitas por *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) a 12,5% de acordo com o método de Laemmli (1970), com algumas modificações. O gel separador foi preparado com 2mL de solução de 30% acrilamida/bisacrilamida (29:1), 1,25mL de tampão Tris HCl pH 8,8 (1,5M tris-hidroximetil-aminometano, 0,4% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), pH 8,8 ajustando com HCl (1M), 1,70 mL de H<sub>2</sub>O, 50µL de 10% de persulfato de amônio e 3µL de TEMED. O gel de empilhamento foi preparado utilizando 0,42 mL de solução a 30% de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0,34mL de tampão Tris HCl pH 6,8 (1M tris-hidroximetil-aminometano, 4% SDS, 1,75 mL de H<sub>2</sub>O, 25µL de depersulfato de amônio 10% e 3µL de TEMED. A corrida foi realizada a 100 volts por 45 minutos.

#### **4.8 Coloração dos géis**

Os géis foram visualizados fixando-os em solução com nitrato de prata de acordo com metodologia descrita por Blum *et al.*, (1987).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Virulência das linhagens UCS03 e Sa86101 do fungo *N. rileyi* sobre *S. frugiperda*.

As duas linhagens demonstraram virulência contra *S. frugiperda*, constatando-se um aumento da mortalidade das lagartas em função do aumento da concentração de conídios.

A linhagem UCS03, isolada de *A. magnífica* (Figura 1) causou 61,3% de mortalidade de *S. frugiperda* na maior concentrada testada ( $5 \times 10^9$  con/mL) e a linhagem Sa86101, isolada de *A. gemmatalis* causou 17,3% de mortalidade nesta mesma concentração.

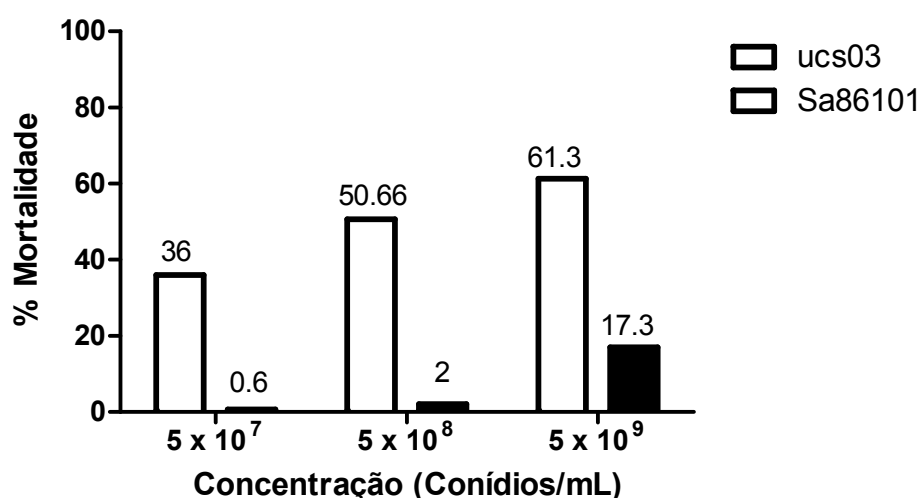


Figura 1. Porcentagem de mortalidade de *S. frugiperda* em ensaios com as linhagens Sa86101 e UCS03, Caxias do Sul, 2016.

De maneira geral os trabalhos que testam a mortalidade de lepidópteros com fungos demonstram uma maior mortalidade nos primeiros ínstares larvais, com a mortalidade apresentando uma queda nos últimos estágios (Inglis *et al.*, 2001).

Vários autores consideram que os entomopatógenos são eficazes quando apresentam valores de mortalidade acima de 40% (Alves *et al.* 1985, Faria *et al.* 1991; Lecuona *et al.* 1996; Silva & Veiga, 1998). O conhecimento da concentração e tempo letal auxilia na seleção do entomopatógeno mais eficaz, na sensibilidade dos insetos à doença e até mesmo para previsões de sua utilização em programas de controle de pragas (Haddad, 1998).



A CL<sub>50</sub> foi determinada apenas para a linhagem UCS03, isolada de *A. magnifica* (2 x 10<sup>9</sup> con/mL) sendo esta linhagem mais efetiva para o controle de *S. frugiperda*, do que a linhagem Sa86101 isolada de *A. gemmatalis* a qual induziu 17,3% de mortalidade.

Em estudos de seleção de isolados, a variação na patogenicidade é observada com frequência, podendo estar relacionada à especificidade e à tolerância do hospedeiro, assim como a variabilidade genética de cada isolado (Alves, 1998). Nesse sentido, Rohde *et al.* (2006), Kaur; Padmaja (2008) e Carneiro *et al.* (2008) avaliaram a suscetibilidade de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* contra *Alphitobius diaperinus*, *Spodoptera litura* e *S. frugiperda* e, também constataram ampla variação na patogenicidade entre os isolados avaliados de uma mesma espécie de fungo.

O fungo *N. rileyi* tem um grande potencial no uso do controle de lagartas, onde 90% de seus hospedeiros pertencem a ordem Lepidoptera (Alves, 1998), demonstrando uma certa especificidade que faz com que um determinado isolado seja muito virulento para um grupo e não seja para outro. Esta característica é considerada uma vantagem do controle microbiano em relação ao químico, pois mesmo quando os micro-organismos são aplicados em altas concentrações, conseguem evitar alterações importantes no agroecossistema, por não afetarem parasitóides, predadores e polinizadores (Alves, 1998).

A barreira física proporcionada pela camada de cera existente no inseto faz com que grande parte do inóculo aplicado fique retida na mesma. Com isso, a porção que entra em contato com o tegumento do inseto não é suficiente para promover o início do processo de infecção. Alguns estudos sugerem que existe um número mínimo de estruturas do patógeno necessárias para desencadear a doença em um inseto (Alves *et al.*, 1998).

Foi observado também que o maior percentual de mortalidade dos insetos ocorreu no sétimo dia após o início do ensaio com a linhagem UCS03 (Figura 2) e no nono dia com a linhagem Sa86101. Isto mostra também a eficiência da linhagem UCS03, quanto ao tempo de infecção no inseto, um dos fatores que deve ser levado em consideração em programas de manejo integrado de pragas, visto que um menor tempo letal promove a redução rápida dos prejuízos econômicos causados pelas pragas.

Acredita-se que a utilização do fungo entomopatogênico *N. rileyi* no controle *S. frugiperda* (Figura 2), possa vir incrementar o manejo integrado de pragas na cultura da videira, racionalizando o uso de agrotóxicos, gerando menor impacto na saúde do consumidor assim como do trabalhador rural e manutenção do equilíbrio ambiental, bem como, em busca por sistemas de produção sustentáveis.

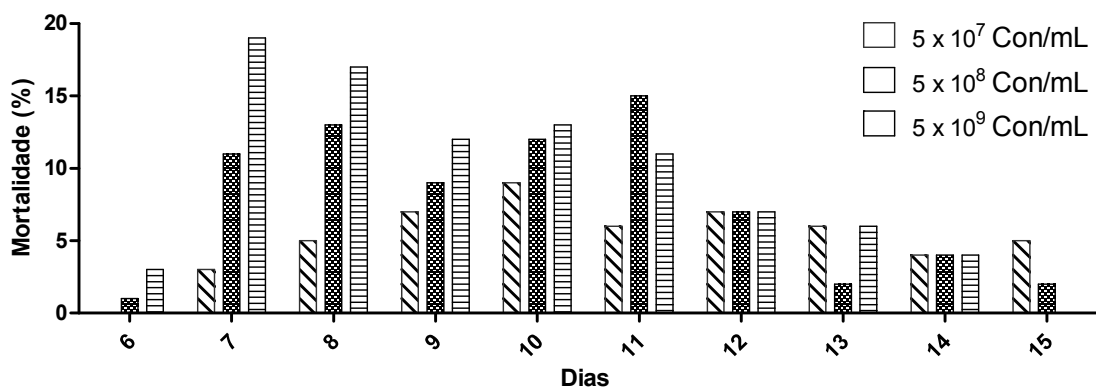


Figura 2. Porcentagem de mortalidade de *S. frugiperda* com a linhagem UCS03, Caxias do Sul, 2016.

Os estudos sobre a seleção de isolados de fungos entomopatogênicos é de grande importância para melhor aproveitamento destes micro-organismos nos programas de manejo integrado, visto que as grandes variações genéticas inerentes aos fungos fornecem a eles características relacionadas à patogenicidade e virulência muito variada. A busca por isolados mais específicos no controle de determinado inseto-praga, necessariamente passa pela seleção dos mesmos. Outros fatores devem ser levados em conta para a determinação da interação patógeno-hospedeiro, como a produção de enzimas degradadoras de cutícula, as quais estão diretamente relacionadas ao processo de infecção dos insetos pelos fungos (Bianco & Perrota, 2015).

Os testes de seleção de entomopatógenos têm como principal função excluir isolados pouco virulentos e com baixa capacidade de penetração e germinação, selecionando os isolados com maior potencial para uma avaliação mais eficiente, tendo na escolha da mortalidade confirmada um parâmetro de seleção com maior confiabilidade e precisão nos dados obtidos (Moino, 1993; Hajek & St. Leger, 1994).

## 5.2. Proteínas totais secretadas pelo fungo

As proteínas são os maiores constituintes da cutícula dos insetos e as proteases extracelulares são produzidas em abundância em fungos crescidos em cultura líquida contendo cutícula de inseto (St. Leger *et al.*, 1986) tendo sido postulado que proteases extracelulares estão envolvidas na hidrólise da cutícula facilitando a penetração da hifa através da cutícula.

Visando identificar um fator relacionado à virulência avaliou-se a quantidade de proteínas extracelulares secretadas pela linhagem UCS03 quando em meio líquido suplementado com cutícula de *S. frugiperda*. O sobrenadante na presença e na ausência de cutículas de *S. frugiperda* foram coletados por 19 dias após a incubação dos micélios. A secreção das proteínas totais aumentou progressivamente com o tempo. A maior produção de proteínas ocorreu no 14º dia após incubação com a cutícula de *S. frugiperda*, sendo de 0,35 mg/mL e, decaindo a secreção de proteínas após este período (Figura 3).

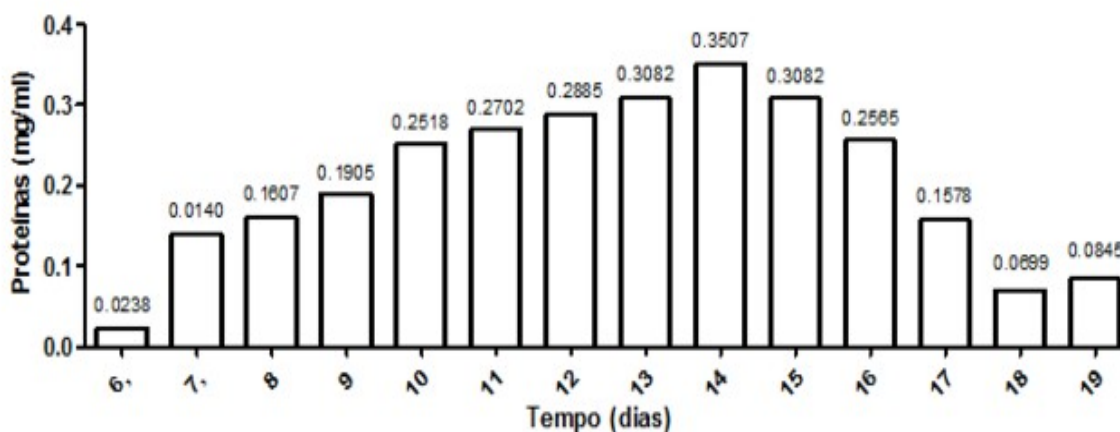


Figura 3. Proteínas totais secretadas pela linhagem UCS03 em função do tempo, em meio suplementado com cutícula de *Spodoptera frugiperda*.

Os resultados obtidos com a técnica de Bradford (1976), foram compatíveis com os resultados observados em SDS-PAGE unidimensional, como pode ser verificado no item 4.3.

### 5.3 Análise das proteínas secretadas

O perfil protéico dos diferentes extratos foi analisado por eletroforese unidimensional -SDS-PAGE (Figura 4). Após a dosagem de proteínas totais nas amostras de sobrenadante, os polipeptídeos secretados pelo fungo *N. rileyi*, foram analisados por SDS-PAGE mostrando uma variação do perfil eletroforético, dependendo do tempo de cultivo em presença da cutícula de *S. frugiperda*.

A partir da quantificação de proteínas (item 4.2) verificou-se que as maiores secreções de polipetídeos ocorreram entre o 12º e 16º dia de incubação do fungo *N. rileyi* em presença da cutícula de *S. frugiperda*, e a partir desta informação foram seguidos os estudos de análise do secretoma por meio do SDS-PAGE.

No gel do sobrenadante observa-se proteínas com massas moleculares de 150 kDa até inferiores a 20kDa, sendo que essas proteínas estão presentes em maior quantidade nos últimos tempos de cultivo.

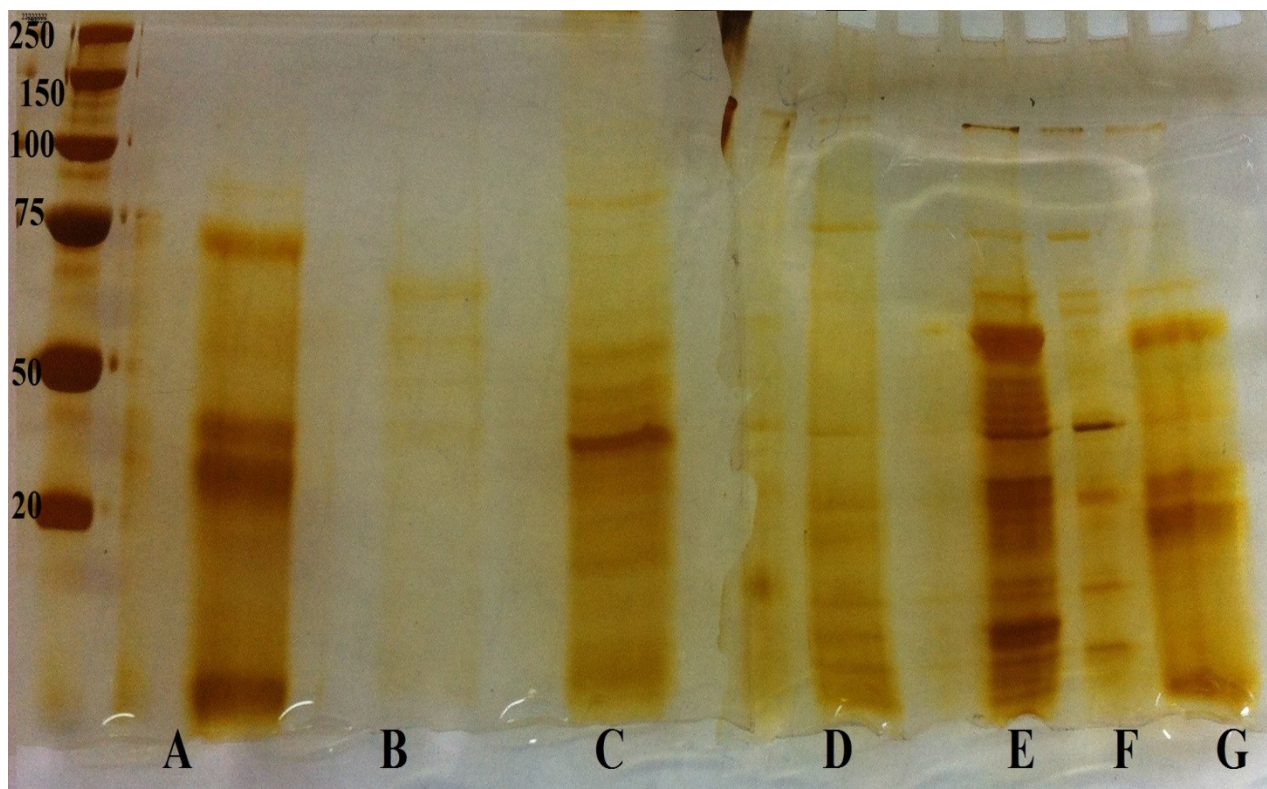


Figura 4. Perfil eletroforético do sobrenadante: (M) Marcador de massa molecular (Benchmark) (A) Controle com cutícula de *S. frugiperda* (B) Controle com *N. rileyi*, (C) Amostra coletada em 13 dias, (D) Amostra coletada em 14 dias, (E) Amostra coletada em 14 dias, (F) Amostra coletada em 15 dias e (G) Amostra coletada em 16 dias.

Na canaleta (A), que é o perfil eletroforético utilizado como controle, sendo utilizado somente a cutícula de *S. frugiperda*, foi possível identificar 4 bandas bem destacadas, provavelmente proteínas estruturais da cutícula; na canaleta (B) foi utilizado apenas o fungo *N. rileyi* sem a cutícula do inseto, mostrando um perfil protéico diferenciado dos demais e praticamente com poucas proteínas a serem consideradas.

No 14º dia (canaleta E), onde mostrou a maior quantidade de proteínas, também pode ser visto diferentes massas moleculares de proteínas, destacando-se proteínas inferiores a 50kDa. O mesmo comparativo pode ser feito nos 15º e 16º dias que tanto pela quantificação (figura 3 e 4) quanto pela massa molecular foi possível verificar uma alteração no perfil proteico.

A análise das proteínas secretadas por *M. anisopliae* e *B. bassiana* em meios de cultura contendo exoesqueleto de *Callosobruchus maculatus*, foi realizada por Murad *et al.*, (2008), onde foi possível traçar uma provável via metabólica na qual as enzimas degradam os principais compostos: quitinas, proteínas, outros carboidratos e amônio. *M. anisopliae* produziu um padrão proteico que apresentou massas moleculares aproximadamente 27 kDa, 30 kDa, 37 kDa, 45 kDa, 50 kDa e 70 kDa.

Ribeiro (2006) demonstrou diferenças nas proteínas secretadas no cultivo em meio líquido de *M. anisopliae* na presença de cutículas de *D. peruvianus*, *A. gemmatalis*, *B. microplus*. Polipeptídios de tamanho aproximado de 30 kDa, secretadas na presença de cutícula de *D. peruvianus* em 72 horas de cultivo, outras proteínas do tamanho aproximado de 22 kDa, presentes em meio de cultivo com cutícula de *A. gemmatalis* após 24 e 72 horas de cultivo e também presentes com cutícula de *B. microplus* em 72 horas de cultivo. Em meio com cutículas de *D. peruvianus* e *A. gemmatalis* observou-se perfis similares, porém na presença de cutícula de *B. microplus* a intensidade de bandas de maior tamanho foi ligeiramente menor e, também, a banda de tamanho aproximado de 29 kDa foi mais intensa e a de 23 kDa menos intensa.

Proteínas secretadas por *T. harzianum* durante nove dias de crescimento utilizando quatro diferentes fontes de carbono (glicose, celulose, xilana e bagaço de cana de açúcar), apresentaram perfis proteicos característicos para cada amostra. Em meio com glicose verificou-se proteínas de 30 kDa, 37 kDa e 40 kDa, meio com celulose proteínas de 14 kDa à 90 kDa, com xilana como fonte de carbono apareceram proteínas com 25 kDa, 20 kDa e 15 kDa e o no meio contendo bagaço de cana as massas moleculares proteicas foram de 66 kDa, 30 kDa, 20 kDa e 14 kDa. Os autores observaram que algumas bandas estavam presentes em mais de uma amostra, enquanto outras eram exclusivas ou muito expressas em determinado secretoma, observaram também que a amostra proveniente da cultura em glicose mostrou um perfil proteico mais simples do que os demais. Por outro lado, a amostra crescida em meio contendo xilana mostrou mais bandas que as amostras coletadas dos meios contendo celulose e bagaço de cana (Mendoza, 2013).

Uma alta diversidade de proteínas encontra-se presente nos proteomas de fungos filamentosos heterogeneidade proporcionada pela aparição de múltiplas modificações pós traducionais, como glicosilação, fosforilação, sulfonação, acetilação e metilação, *splicing* alternativo entre outras, que são extremamente importantes porque determinam a função, estabilidade e localização das proteínas (Kim *et al.*, 2007).

Este perfil proteico diferenciado pode estar envolvido na degradação e captação de nutrientes da cutícula desidratada de *S. frugiperda*, fato que poderá ser comprovado por meio de espectrometria de massas. Os resultados indicam ser *N. rileyi* um fungo promissor no controle da praga, entretanto, são necessários mais estudos para definir de forma precisa a aplicação deste agente de controle no manejo de *S. frugiperda* e outras pragas da videira, levando sempre em consideração a relação custo-benefício e as condições do ambiente.

## 6. CONCLUSÕES

- A linhagem UCS 03 do fungo entomopatogênico *N. rileyi* foi mais virulenta (CL<sub>50</sub> de  $2 \times 10^9$  con/mL) do que a linhagem Sa86101 para *S. frugiperda*, a qual induziu 17,3% de mortalidade de *S. frugiperda*;
- Proteínas extracelulares do secretoma da linhagem UCS03 quando em presença da cutícula desidratada de *S. frugiperda* mostraram diferentes quantidades em relação ao tempo de cultivo;
- A maior produção de proteínas totais da linhagem UCS03 ocorreu no 14º dia após incubação com a cutícula de *S. frugiperda*, sendo de 0,35 mg/mL;
- Foi possível verificar diversos perfis eletroforéticos nos diferentes tempos de cultivo quando avaliadas as amostras do sobrenadante por gel unidimensional;
- Os perfis eletroforéticos avaliados por SDS-PAGE entre 12 a 16 dias de cultivo sugerem que as massas moleculares dos polipeptídeos são inferiores a 75kDa;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, B. S. (1998) Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B., L.E.M. Pádua, E.M.V.M. Azevedo & L.C. Almeida. (1985). Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 20: 403-406.
- Akbar, T. A.; Akbar, R. A. (2013). Pesticide Health Risk Mapping and Sensitivity Analysis of Parameters in Groundwater Vulnerability Assessment. Clean – Soil, Air, Water. v.41, n.11, p. 1073-1079,.
- Bento, J. M. S. (1999). Perdas por insetos na agricultura. Ação ambiente, v.2, n. 4, p. 19-21.
- Bekker Charissa , Philip B. Smith , Andrew D. Patterson, David P. Hughes (2013). Metabolomics Reveals the Heterogeneous Secretome of Two Entomopathogenic Fungi to Ex Vivo Cultured Insect Tissues. PLOS ONE, 8(8): e70609
- Beys-da-Silva, W.O., Santi, L., Berger, M., Calzolari, D., Passos, D.O., Guimaraes, J.A., Moresco, J.A., Yates, J.R. (2014). Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. Journal of Proteome Research, 13(5) 2282–2296.
- Bianco, L. & Perrota, G. (2015). Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: from sample preparation to secretome analysis. International Journal of Molecular Sciences, 16: 5803-5820.
- Bidochka, M.J.; and Khachatourian, G.G. (1994). Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. Journal of Invertebrate Pathology, 63: 7-13.
- Blum, H., Beyer H., Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8:93-97.
- Botton, M.; Arioli, C.; Silva, A. da; Baronio, C. (2012). Efeito adverso. Cultivar Hortaliças e Frutas, Pelotas, 11: 7, 414-15.



Bradford, M. M (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding . *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Campos, R.A., Arruda, W., Boldo, J.D., Silva, M.V., Barros, N.M., Azevedo, J.L., Schrank, A., Vainstein, M. H. *Boophilus microplus* Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. *Current Microbiology*; v. 50, p. 257–261, 2005.

Carneiro, A.A.; Gomes, E.A.; Guimarães, C.T; Fernandes, F.T.; Carneiro, N.P.; Cruz, I. (2008). Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria spp.* to fall armyworm. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43,513-520.

Casadevall A. (2007). Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews*, 21(4)130-132.

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

Dhar, P. &Kaur, G.(2010). Production of cuticle - degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media .*African Journal of Biochemistry Research*, 4(3) 65-72.

Devi, P. S. V.; Prasad, Y. G.; Chowdary, D. A.; Rao, L. M. & Balakrishnan, K. (2003). Identification of virulente isolates of the entomopathogenic fungus *N. rileyi* (Samson) for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Mycopathologia*. 156:365-373.

Diez-Rodríguez, G. & Omoto, C. (2001). Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. *Neotropical Entomology* 30(2): 311-316

Eilenbergh, H., Pnini-Cohens, S., Schsuter S, Movtchan, A., Zilberstein, A.(2006). Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of experimental botany* 57(11):2775-84

Efrom, C. F. S., Bortoli, L. C. A. B., Specht, A., Botton, M. (2014). Bioecologia e Controle de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) em Videira no Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 7 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 150). Acessado em 10/08/2016 <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/989042/1/ComunicadoTecnico150.pdf>.

El-Sayed, G. N.; Ignoffo, C.M.; Leathers, T.D. (1991). Effects of cuticle source and concentration on germination of conidia of two isolates of *Nomurea rileyi*. Mycopathologia, 113:95-102.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2006). Indicações técnicas para o cultivo da soja da soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina 2006/2007. XXXIV Reunião de pesquisa de soja da Região Sul. Disponível (on line): [http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2006/reuniao\\_tecnica/indicadores\\_soja2006.pdf](http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2006/reuniao_tecnica/indicadores_soja2006.pdf)

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2007). Contribuição de sistemas de manejo do solo para a produção sustentável da soja. Embrapa Soja – Circ. Téc. 46. 4p.

Faria, L.L.F., J.V. Oliveira & R. Barros. 1991. Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) sob condições de Laboratório. Cad.Ômega 4: 207-217.

Feng P, Shang Y, Cen K, Wang C. 2015. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 112:11365-11370.

Franceschini, M.; Guimarães, A.P.; Camassola, M.; Frazzon, A.P.; Baratto, C.M.; Kogler, V.; Silva, M.V.; Dutra, V.; Nakazoto, L.; Castro, L.; Santi, L.; Vainstein, M.H.; Schrank, A. (2001) Biotecnologia aplicada ao controle biológico. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 23:32-37.

Fonseca, F. L. da. (2006). Ocorrência, monitoramento, caracterização de danos e parasitismo de noctuidae e geometridae em pomares comerciais de macieira em Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil. Tese (Doutorado em Entomologia) – Curso de Pósgraduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Gallo, D., O. Nakano, S.S. Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Batista, E.B. Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002. Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.

Golo Patrícia & Huarrisson A. Santos & Wendell M. S. Perinotto & Simone Quinelat & Isabele C. Angelo & Mariana G. Camargo & Fillipe A. Sá & Carlos L. Massard & Éverton K. K. Fernandes & Donald W. Roberts & Vânia R. E. P. Bittencourt. 2015. The influence of conidial Pr1 protease on pathogenicity potential of *Metarhizium anisopliae* sensu lato to ticks. Parasitol Res, 114:2309–2315 DOI 10.1007/s00436-015-4426-y

Greene, G.L.; Lepla, N.C.; Dickerson, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. Journal of Economic Entomology, Lanham, v.69, n.4, p.488-497, 1976.

Greenbaum, D.; Luscomb, N.M.; Janser, R. *et al.* Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'Oming in on function. Genome Res., v.11, p. 1463-1468, 2001.

Haddad, M. L. Utilização de Polo-PC para análise de Probit. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 999-1012, 1998.

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

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential (pp.23–69). Wallingford, UK: CABI Publishing.

Kaur, G.; Padmaja, V. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR. African Journal of Microbiology Research, v.2, p.299-307, 2008.

Kepler RM, Humber RA, Bischoff JF, Rehner SA. 2014. Clarification of generic and species boundaries for metarhizium and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia* 106:811-829.

Kim, Y. J.; Lees, S. W.; Cho, J. R.; Park, H. M.; Ahn, Y. J. (2007) Multiple resistance and biochemical mechanisms of dicofol resistance in *Tetranychusurticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, San Diego, 10 (2) 165-170.

Labrador, J. R. *Estudio de Biología y Combate del Gusano Cogollero del maíz Laphygma frugiperda*. Maracaibo: S. & A. Universidad del Zulia, 1967. 83 p.

Lecuona, R.E., M.S. Tigano & B.M. Diaz. 1996. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera; Pyralidae) in Argentina. *An. soc. Entomol. Brasil* 25: 299-307.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 227:680-685.

Lopes, R.B. (2009). A indústria no controle biológico: Produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (eds.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013). Acessado em 10/08/2016, <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>

Mendoza, D.P.G (2013) Proteômica aplicada à caracterização do secretoma de *Trichoderma harzianum*. Dissertação de doutoramento. Universidade de Brasília. Brasília, DF.

Miranda, J.E.; Suassuna, N.D. Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Campina Grande: EMBRAPA, CNPA, 2004. 48p.

Moino JR. A. Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para controle de pragas de grãos armazenados. 1993. 100f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

Murad, A.; Noronha, R.; Miller, R.; Costa (2008). Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest *Callosobruchus maculatus*, *Microbiology* 154:3766-3774.

Nunes, A.R.F., Martins, J.N., Furlaneto, M.C. & Barros, N. M. (2010). Production of cuticle-degrading proteases by *Nomurea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis*. *Ciência Rural*, 40(9):1853-1859.

Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO. 2013. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*4:357-374.

Parra, JRP. (2000) O controle biológico e o manejo de pragas: passado, presente e futuro, p. 59-70. In J. C. Guedes, I.D. Costa & E. Castiglioni (Eds.), *Bases e técnicas do manejo de insetos*. Santa Maria: UFSM, CCR, DFS. 248p.

Pavone, D.; Díaz, M.; Trujillo, L.; Dorta, B. (2009). A granular formulation of *Nomurea rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) 34(2):130-134.

Poletto, G., Benedetti, AJ., Barros, NM., Vargas, LRB. And Specht, A.(2010). *Aucula magnifica* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Noctuidae: Agaristinae): morphology of egg and last instar larvae. *Braz. J. Biol.*, 70 (2) 373-380.

Quintela, E. D.; Teixeira, S. M.; Ferreira, S. B.; Guimarães, W. F. F.; Oliveira, L. F. C.; Czepak, C. (2007) Desafios do manejo integrado de pragas da soja em grandes propriedades no Brasil Central. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 65 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 149)

Rampitsch, C.; Day, J. (2013). Comparative secretome analysis of *Fusarium graminearum* and two of its non-pathogenic mutants upon deoxynivalenol induction in vitro. *Proteomics* 2013, 00, 1–9.

Ribeiro, T.S. (2006). Análise comparativa da secreção de proteases e quitinases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* na presença de diferentes cutículas de artrópodes. Dissertação de Mestrado. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

Ribeiro DA, Cota J, Alvarez TM, Bruchli F, Bragato J, Pereira BM, Pauletti BA, Jackson G, Pimenta MT, Murakami MT, Camassola M, Ruller R, Dillon AJ, Pradella JG, Paes Leme AF, Squina FM. (2012) The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse.

Rohde, C.; Alves, L.F.A.; Neves, P.M.O.J.; Alves, S.B.; Silva, E.R.L.; Almeida, J.E.M. (2006). Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, 35:231-240.

Rustiguel, C. B., Rosa, J. C., Jorge, J. A., Oliveira, A.H.C, Guimarães, L. H. S..2016. Secretome Analysis of *Metarhizium anisopliae* Under Submerged Conditions Using *Bombyx mori* *Chrysalis* to Induce Expression of Virulence-Related Proteins. *Curr Microbiol*, 72:220–227. DOI 10.1007/s00284-015-0943-2

Santos, K. B. D.; Menegum, A. M.; Santos, W. J. dos; Neves, P. M. O. J.; Santos, R. B. dos. Caracterização dos danos de *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) a estruturas de algodoeiro. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 39, n. 4, p. 626-631, 2010.

Santos, K. B. D.; Menegum, A. M.; Santos, W. J. dos; Neves, P. M. O. J.; Santos, R. B. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 34, n. 6, p. 903-910, 2005.

Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56:1267–1274.

Screen S.E.; Hu, G., St. Leger, (2001). Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *Anisopliae* over expressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78:260-266.

Shah PA, Pell JK (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:413–423

Shang , Y ; Xiao, G.; Cen, P. Z. K.; Zhan, S. & Wang, C. 2016. Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* 8(5):1374–1387 doi:10.1093/gbe/evw082

Shanthakumar, S. P., Murali, P. D., Malarvannan, S., Prabavathy, V. R., and Sudha, N. (2010). Laboratory evaluation on the potential of entomopathogenic fungi, *Nomuraearileyi* against tobacco caterpillar, *SpodopteralituraFabricius* (Noctuidae: Lepidoptera) and its safety to *Trichogramma* sp. *J. Biopesticides* 3, 132–137.

Silva, R.B.Q. & A.F.S.L. Veiga. 1998. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre *Castnia icarus* (Cramer, 1775). *Rev. Agric.* 73: 119-127.

Sindag. (2008) Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Dados de produção e consumo de agrotóxicos. Disponível em [www.sindag.com.br](http://www.sindag.com.br).

Sinitox. (2004) Sistema nacional de informações tóxico-farmacológica. FIOCRUZ. [www.fiocruz.br/sinitox](http://www.fiocruz.br/sinitox).

Srisukchayakul, P.; Wiwat, C. & Pantuwatana. S. (2005). Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomurea rileyi* against *Spodoptera litura*. *Science Asia*. 31:273-276.

St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47: 295-302.

St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo, N.W.; Roberts, D.W. (1996). Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (4):1257-1264.

St Leger RJ, Wang C. 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85:901-907

Soares, W.L. (2010). Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura. Fundação Oswaldo Cruz, Fio Cruz. Rio de Janeiro, Brasil.

Suwannakut, S.; Boucias, D. G. & C. Wiwat. (2005). Genotypic analysis of *Nomurea rileyi* collected from various noctuid hosts. *J Invertebr Pathol.* 90: 169-176.

Tiago, P.V. & Furlaneto, M.C. 2003. Papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. *Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais, Alta Floresta*, 2(1):40-51

Thakre, M., Thakur, M., Malik, N., and Ganger, S. (2011). Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. *J. Biopesticides* 4, 176–179.

Urban M, Pant R, Raghunath A, Irvine AG, Pedro H, Hammond-Kosack KE. 2015. The pathogen-host interactions database (PHI-base): Additions and future developments. *Nucleic Acids Res.* 43:D645- 655.

Van de Wouw AP, Howlett BJ. 2011. Fungal pathogenicity genes in the age of ‘omics’. *Mol Plant Pathol.* 12:507-514.

Wang C, Feng MG. 2014. Advances in fundamental and applied studies in china of fungal biocontrol agents for use against arthropod pests. *Biol Control* 68:129-135.