

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Virulência de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e sua relação com a estrutura e composição cuticular de larvas de lepidópteros-praga

EDEGAR FRONZA

**CAXIAS DO SUL
2013**

Edegar Fronza

Virulência de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e sua relação com a estrutura e composição cuticular de larvas de lepidópteros-praga

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Neiva Monteiro de Barros
Co-orientadores: Dr. Alexandre Specht e Dr. Horácio Heinzen

Caxias do Sul
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

F936v Fronza, Edegar
Virulência de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e sua relação com a estrutura e composição cuticular de larvas de lepidópteros-praga / Edegar Fronza. – 2013.
93 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.
Orientador: Dr.^a Neiva Monteiro de Barros ; Co-orientadores: Dr. Alexandre Specht e Dr. Horácio Heinzen.

1. Fungos entomopatogênicos. 2. Fungos como agentes no controle biológico de pragas. 3. Virulência (Microbiologia). 4. Biotecnologia. I. Título.

CDU 2.ed.: 582.28:632.937

Índice para o catálogo sistemático:

1. Fungos entomopatogênicos	582.28:632.937
2. Fungos como agentes no controle biológico de pragas	632.937
3. Virulência (Microbiologia)	602.642:578.822.9
4. Biotecnologia	60

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

Edegar Fronza

Virulência de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e sua relação com a estrutura e composição cuticular de larvas de lepidópteros-praga

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

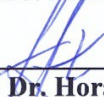
TESE APROVADA EM 16 DE DEZEMBRO DE 2013



Dra. Neiva Monteiro de Barros



Dr. Alexandre Specht



Dr. Horácio Heinzen



Dr. João Lúcio de Azevedo



Dra. Lídia Mariana Fiuza



Dra. Maria Veronica Cesio

À minha família, em especial à minha mãe, Therezinha (*in memoriam*),
e ao meu pai, Aurílio.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela minha vida, por colocar no meu caminho pessoas que me possibilitaram realizar uma tarefa que eu não poderia realizar sozinho;

À minha família, pelo apoio constante, incentivo, e por tudo o que representam na minha vida, e à minha namorada, pela paciência e compreensão pelos finais de semana no laboratório, pela ajuda, incentivo e companheirismo.

Meus agradecimentos à Universidade de Caxias do Sul e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, por possibilitar a realização do trabalho;

À Dra. Neiva Monteiro de Barros, por toda a orientação, apoio e pelos ensinamentos;

Ao Dr. Alexandre Specht, da Embrapa Cerrados, e ao Dr. Horácio Heinzen, da Universidad de la República do Uruguai (UdelaR), pelo auxílio durante todo trabalho e pelos conhecimentos transmitidos e à Dra. María Veronica Cesio e ao Dr. Sidnei Moura, pelas contribuições e sugestões no decorrer do trabalho;

Ao CNPq e à Capes, pelo suporte financeiro;

A todos os colegas, bolsistas e funcionárias do Laboratório de Controle de Pragas que auxiliaram na criação das lagartas e nos bioensaios, especialmente à Janaíne, Aline e Priscila, e a todos pela amizade e convivência no laboratório;

Ao pessoal do Laboratório de Farmacognosia y Productos Naturales da Facultad de Química da UdelaR, especialmente ao Alejandro, Ignacio, Manuel, Maria José, Ximena, Sara, Lucía, Marco, Carlos, Natalia e Andrés, pelo auxílio nas análises químicas, nas quais eu era um marinheiro de primeira viagem e pela amizade que cultivamos;

À Cristina San Juan e a Juan e Beatriz Bausero Lopez, que me acolheram em suas casas durante minha permanência em Montevideo, pela hospitalidade e sempre proporcionar condições para realizar minhas atividades;

Aos meus amigos Rafael, Allander, Jucimar e Elvio, pela amizade que cultivamos, pelo apoio e companheirismo, que muitas vezes revigoraram meu ânimo com uma simples roda de chimarrão, um café ou com um suculento churrasco;

Aos colegas da Secretaria Municipal de Educação de Bento Gonçalves, pelo apoio, pela amizade e pela compreensão com meus horários imprevisíveis;

E finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram e que não mencionei, e foram muitos, peço que não se sintam excluídos, pois por mais que eu tentasse agradecer a todos, sempre faltaria alguém, a todos, o meu muito obrigado.

INDICE

1. RESUMO	7
2. ABSTRACT	8
3. INTRODUÇÃO	9
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
6. CAPÍTULO 1 Identification of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate from the cuticle of soybean pods armyworm (<i>Spodoptera cosmioides</i>)	17
7. CAPÍTULO 2 Concentration of vitamin E in the cuticle of caterpillars (Lepidoptera: Noctuoidea) and its relationship with resistance to infection by <i>Nomuraea rileyi</i>	21
8. CAPÍTULO 3 Superfície e composição lipídica cuticular de larvas de of <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Spodoptera cosmioides</i> e sua influência na susceptibilidade diferencial a <i>Nomuraea rileyi</i>	26
9. CAPÍTULO 4 Superfície e composição lipídica cuticular de larvas de <i>Mythimna sequax</i> e <i>Rachiplusia nu</i> e susceptibilidade a <i>Nomuraea rileyi</i>	47
10. CAPÍTULO 5 Espécies hospedeiras de <i>Nomuraea rileyi</i> e seu potencial como biopesticida: fronteiras e perspectivas	60
11. CONCLUSÕES	86
12. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	88

RESUMO

Nomuraea rileyi é um entomofungo que infecta principalmente lepidópteros representantes da superfamília Noctuoidea, que inclui pragas-chave de diversas culturas de grande importância econômica. No entanto, a susceptibilidade das espécies a este agente é variável, mesmo entre representantes da mesma família e até de mesmo gênero. Um dos fatores responsáveis por esta susceptibilidade diferenciada pode ser a composição lipídica da cutícula larval. O objetivo deste estudo foi avaliar a estrutura e composição cuticular de larvas de lepidópteros e sua relação com a susceptibilidade a *N. rileyi*. Foram utilizadas as espécies *Anticarsia gemmatalis*, *Mythimna sequax*, *Rachiplusia nu* e *Spodoptera cosmioides* e duas linhagens do fungo (CH87551 e UB93150). Larvas de segundo instar foram obtidas a partir da criação massal no Laboratório de Controle de Pragas da Universidade de Caxias do Sul e submetidas a suspensões de 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL por 24 horas e após, transferidas para recipientes de 200mL contendo dietas artificiais específicas. Os bioensaios foram mantidos em condições controladas e avaliados diariamente por 14 dias. Para análise da composição lipídica cuticular, exúvias oriundas da metamorfose larval-pupal foram submetidas à extração com hexano e posteriormente à diclorometano-metanol. Para obtenção das exúvias de *M. sequax*, as larvas foram alimentadas com *Lolium multiflorum*. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia de camada delgada e seus componentes separados por cromatografia em coluna aberta, cujas frações resultantes foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (GCMS). Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas de larvas de segundo instar de cada espécie, submetidas uma suspensão de 10^8 conídios/mL e analisadas 24, 48 e 72 horas após a exposição ao patógeno. Os resultados demonstraram que as espécies avaliadas foram diferentemente afetadas por *N. rileyi* e, mesmo pelas diferentes linhagens avaliadas. A CL_{50} (log dose) obtida com as linhagens CH e UB foi de 6,73 e 7,97 para *A. gemmatalis* e 8,26 e 9,16 para *R. nu* respectivamente. *S. cosmioides* foi susceptível apenas à linhagem UB, porém a taxa de mortalidade foi de apenas 11,5% na maior concentração e *M. sequax* não foi susceptível a nenhuma das linhagens avaliadas. A composição lipídica cuticular apresentou diferenças quali-quantitativas entre as larvas. Os principais componentes identificados em *A. gemmatalis*, *M. sequax* e *R. nu* foram hidrocarbonetos, respondendo por 72,3, 74,5 e 83,6% respectivamente, com menor diversidade de compostos para *M. sequax*. Ácidos graxos lineares e ramificados (C_{14} a C_{20}) foram identificados, com diferentes composições em cada uma das espécies. Identificou-se um aldeído e um álcool graxo em *A. gemmatalis* e outro aldeído graxo em *R. nu*. Em *S. cosmioides*, o componente majoritário identificado foi vitamina E, com mais de 70%. Nas imagens de MEV foi possível observar conídios de *N. rileyi* aderidos à superfície cuticular das quatro espécies avaliadas, especialmente na região abdominal e nos pseudopodes, mesmo depois de 48 horas após contato, sobretudo em *S. cosmioides* e *M. sequax*, espécies nas quais muitos dos conídios visualizados apresentaram tubo germinativo crescendo paralelamente à superfície. As espécies que se mostraram mais susceptíveis nestes bioensaios foram as que apresentaram, além de grandes quantidades de alcanos, as maiores diversidades destes compostos. As espécies menos susceptíveis apresentaram pouca quantidade e/ou variedade de alcanos ou ainda algum composto antioxidante, como no caso da vitamina E. Os resultados obtidos sugerem que, além das diferenças na composição lipídica e na estrutura cuticular das larvas, a variabilidade de *N. rileyi* pode estar relacionada à susceptibilidade diferenciada observada nas espécies, no entanto o potencial de uso deste agente como ferramenta no manejo integrado de pragas é considerável e precisa ser mais bem compreendido e explorado.

ABSTRACT

Nomuraea rileyi is an entomofungus that mainly infects lepidopteran representatives of the Noctuoidea superfamily, which includes key-pests of various crops of large economic importance. Nevertheless, the susceptibility of species in relation to this agent is variable, even among representatives of the same family or genus. One of the factors responsible for this differentiated susceptibility might be the lipid composition of the larval cuticle. The aim of this study was to assess the cuticular structure and composition of lepidopteran larvae and their relationship with the susceptibility to *N. rileyi* fungi. The species *Anticarsia gemmatalis*, *Mythimna sequax*, *Rachiplusia nu* and *Spodoptera cosmioides* and two strains of the fungus (CH87551 and UB93150) were used. Second instar larvae were obtained from the mass creation of the Pest Control Laboratory at the University of Caxias do Sul and subjected to suspensions of 10^7 , 10^8 and 10^9 conidia/mL for 24 hours and subsequently transferred to 200mL containers containing specific artificial diets. The bioassays were maintained in controlled conditions and assessed daily for 14 days. In order to perform an analysis of the cuticular lipid composition, exuviae derived from the larval-pupal metamorphosis were subjected to extraction with hexane and with dichloromethane-methanol afterwards. For obtaining the *M. sequax* exuviae, the larvae were fed with *Lolium multiflorum*. The obtained extracts were analyzed by means of slender layer chromatography and their components were separated using open column chromatography components, whose resulting fractions were analyzed through gas chromatography attached to mass detector (GCMS). Images of scanning electron microscopy (SEM) were obtained from second instar larvae of each species, subjected to a suspension of 10^8 conidia/mL and analyzed 24, 48 and 72 hours after exposure to the pathogen. The results showed that the assessed species were differently affected by *N. rileyi* fungi or even by different assessed strains. The LC_{50} (log dose) obtained with the CH and UB strains was 6,73 and 7,97 for *A. gemmatalis* and 8,26 and 9,16 for *R. nu* respectively. *S. cosmioides* was susceptible only to the UB strain, but the mortality was limited to 11.5% in the highest concentration and *M. sequax* was not susceptible to any of the assessed strains. The cuticular lipid composition showed qualitative and quantitative differences between the larvae. The main components identified in *A. gemmatalis*, *M. sequax* and *R. nu* were hydrocarbons, accounting for 72,3, 74,5 and 83,6% respectively, with lower diversity of compounds for *M. sequax*. Linear and branched fatty acids (C_{14} to C_{20}) have been identified, with different compositions in each one of the species. It was found an aldehyde and a fatty alcohol in *A. gemmatalis* and other fatty aldehyde in *R. nu*. In *S. cosmioides*, the major identified component was vitamin E, with more than 70%. In the SEM images, it was possible to observe conidia of *N. rileyi* attached to the cuticular surface of the four assessed species, especially in the abdominal region and in pseudopods, even after 48 hours of contact, mainly in *S. cosmioides* and *M. sequax*, species in which many observed conidia showed germ tube growing in tandem with the surface. The species that were more likely in these bioassays were the ones that presented, in addition to large amounts of alkanes, the greatest diversities of these compounds. The less susceptible species showed little quantity and/or variety of alkanes or even some antioxidant compound, as in the case of the vitamin E. The obtained results suggest that, besides differences in the lipid composition and cuticular structure of the larvae, the variability of *N. rileyi* might be related to the differentiated susceptibility observed in species, however, the potential usage of this agent as a tool for holding an integrated pest management is sizeable and needs to be better understood and explored.

INTRODUÇÃO

Insetos-praga de cultivos estão entre as principais causas de perdas econômicas na produção agrícola, seja por perdas diretas ou por necessidade de aplicação de produtos para seu controle, o que eleva os custos de produção. Entre estes insetos, algumas espécies de noctuídeos (Lepidoptera) se destacam como pragas em diversas culturas de elevada importância econômica, como soja, milho e trigo, entre outras.

Entre as formas de controle de pragas, o controle biológico, dentro do Manejo Integrado de Pragas, apresenta-se como alternativa sustentável ao uso de pesticidas, uma vez que não apresenta os inconvenientes ambientais dos agroquímicos e o agente de controle, em muitos casos, pode manter-se no ambiente. Um desses agentes é o fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, um fungo cosmopolita que tem entre seus hospedeiros preferenciais lepidópteros das famílias Noctuidae e Erebidae.

Este patógeno tem sido objeto de estudos que, ao longo dos anos vem contribuindo para a elucidação de seus mecanismos de ação e caracterização genética visando seu uso como biopesticida. Entretanto, a compreensão da interação patógeno/hospedeiro ainda não é totalmente conhecida e os fatores envolvidos na patogenicidade ainda não são bem claros, visto que há variabilidade entre linhagens de *N. rileyi* e a gama de espécies atacadas é relativamente restrita, atingindo apenas algumas dezenas de espécies e de maneira diferencial entre espécies do mesmo grupo taxonômico e entre diferentes linhagens do patógeno.

Um dos possíveis aspectos que interferem na susceptibilidade ou não de larvas à *N. rileyi* pode ser a composição lipídica cuticular que, dependendo dos compostos presentes, pode inibir a adesão conidial, dificultar a germinação ou ainda impedir a penetração do tubo germinativo no inseto.

Os objetivos deste trabalho foram analisar a susceptibilidade de larvas de quatro espécies de lepidópteros-praga à *N. rileyi*, determinar a composição lipídica cuticular destas espécies, identificar os principais componentes lipídicos presentes, e avaliar a estrutura e composição cuticular destas espécies, incluindo observações diretas da interação entre conídios e cutícula, e sua relação com a susceptibilidade ao patógeno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O número total de espécies de insetos descritas é de cerca de um milhão, das quais aproximadamente 10% são pragas, prejudicando plantas, animais domésticos e o próprio homem (Gallo *et al.*, 2002).

Na ordem Lepidoptera, diversas espécies são consideradas pragas por atacarem várias culturas de importância econômica, como algodão, milho, pastagens, soja, trigo, entre outras. A Superfamília Noctuoidea (Lepidoptera: Noctuidae), por exemplo, inclui diversas espécies de importância agrícola, devido às suas larvas causarem danos econômicos à diversas culturas. Em Noctuidae, uma família deste táxon, é registrada a presença de mais de 350 espécies apenas no Rio Grande do Sul (Specht & Corseuil 1996; 1998; 2001; 2002b), com muitas das quais tendo o estágio larval caracterizado por hábitos subterrâneos, alimentação voraz e uso de diversas plantas hospedeiras. Neste grupo encontram-se importantes pragas de culturas como o milho (*Spodoptera* spp.), o trigo (*Mythimna sequax* Franclemont, 1951) e a soja (*Spodoptera* spp. e plusiíneos diversos, entre os quais *Rachiplusia nu* Gueneé, 1852). Além de Noctuidae, também Erebidae (Lafontaine & Schmidt, 2010) inclui pragas agrícolas importantes, com destaque para a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Gallo *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 1968).

O gênero *Spodoptera* Gueneé, 1852 é cosmopolita e composto por 30 espécies das quais 15 são pragas agrícolas polífagas (Zenker *et al.*, 2007). *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858 ocorre em diversas plantas hospedeiras incluindo soja, milho, sorgo, macieira, cebola, algodoeiro, pimentão, tomateiro, mamona, feijão, feijão caupi, eucalipto, abacaxizeiro, arroz, mangueira e berinjela, entre outras (Bavaresco *et al.*, 2003). Sua ocorrência está restrita a América do Sul (Bavaresco *et al.*, 2001), porém sua importância tem sido crescente nas regiões produtoras de soja ocasionando aumento da aplicação de inseticidas para seu controle.

O gênero *Mythimna* Franclemont, 1951 inclui as lagartas-militares verdadeiras, destacando-se *M. sequax* (sensu Lafontaine & Schmidt, 2010 - antes *Pseudaletia*) uma espécie polifitófaga que pode alimentar-se de grande variedade de vegetais, muitos dos quais de considerável importância econômica como milho, sorgo, arroz, centeio, cevada, tomate, etc. (Biezanko *et al.*, 1974), sendo uma das pragas mais importantes do trigo e triticale, tanto por seus danos como pelo difícil controle, tendo o nível de dano econômico em apenas 10 lagartas por metro quadrado (Grego *et al.*, 2006). Também é citada como praga chave em azevém (Specht & Corseuil, 2002a) e ocorre em toda a América (Poole, 1989).

A lagarta-falsa-medideira *R. nu* é considerada praga do girassol, do linho e da soja, no entanto, é capaz de desenvolver-se sobre uma grande variedade de espécies de diversas famílias

botânicas. Apresenta um ciclo vital de cerca de 40-45 dias, dos quais cerca de 18 a 25 dias correspondem à fase larval, distribuídos em 5 ínstaes. Ocorre no Brasil desde o sul da Bahia em direção ao Sul, Argentina Chile, Paraguai e Uruguai. Sua importância econômica baseia-se na importância das culturas e órgãos vegetais atacados, visto que pode alimentar-se de folhas e também de partes da inflorescência no girassol, folhas e vagens tenras de soja, causando danos diretos na produtividade. Além disso, o surgimento de resistência a inseticidas piretróides dificulta o controle desta espécie no Uruguai, Argentina e Chile (Chiaravalle, 2006).

Principal desfolhadora da soja, *A. gemmatilis* apresenta preferência por leguminosas, mas pode ser encontrada em baixa densidade em Malváceas. Esta espécie alimenta-se de folhas tenras e por esse motivo é encontrada com frequência no terço superior das plantas, fato que facilita seu controle químico (Herzog & Todd, 1980) e biológico (Moscardi, 1998). Ocorre desde os 40° de latitude norte nos Estados Unidos até os 39° de latitude sul na Argentina (Sosa-Gómez, 2004). Em campo, populações desta espécie são naturalmente dizimadas por epizootias ocasionadas pelo fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) (Allen *et al.*, 1971, Boucias *et al.*, 2000)

Uma das alternativas de controle de pragas é o controle biológico, que é um dos pilares do manejo integrado de pragas (Gallo *et al.*, 2002) e tem despertado interesse dos pesquisadores por diversos motivos entre os quais se destacam o fato de não apresentarem alguns dos efeitos negativos dos defensivos químicos; menor custo, uma vez que o agente de controle pode se estabelecer no ambiente; seletividade; não surgimento de resistência, entre outras vantagens (Alves, 1988). Nesse contexto, o uso de micro-organismos tem se mostrado uma alternativa eficiente, econômica e duradoura, com resultados comprovados a nível de campo (Alves & Lopes, 2008; Bravo, 2011; Moscardi, 1998).

Entre os micro-organismos utilizados no controle biológico encontram-se os fungos, que ao contrário de outros micro-organismos patogênicos, não precisam ser ingeridos para causar infecção e sua utilização se fundamenta na capacidade de infecção por contato, causando doença e morte num processo dependente de fatores bióticos e abióticos. Para ser efetivo como agente de biocontrole, o fungo deve penetrar no inseto (Boucias & Pendland, 1982; Thorvilson *et al.*, 1985). A etapa inicial de infestação se dá pela adesão e germinação de conídios do fungo na superfície do inseto, seguida de penetração da hifa, envolvendo dois processos principais: o físico, devido à pressão da hifa terminal que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas, e o químico, resultante da produção de enzimas (proteases, quitinases e lipases), as quais facilitam a penetração mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo (El-Sayed *et al.*, 1991; 1993; Smith *et al.*, 1981, Xiong *et al.*, 2013). Alguns produzem uma estrutura denominada apressório, que corresponde a uma dilatação da hifa onde normalmente ocorre grande atividade enzimática tendo como objetivo

degradar a cutícula e penetrar no inseto, já outros, como o fungo *N. rileyi*, formam uma massa mucilaginosa ao redor do tubo germinativo, a qual também teria função de adesão e produção de enzimas (Boucias & Pendland, 1991; Alves, 1998; Srisukchayakul *et al.*, 2005).

A patogenicidade e a virulência podem variar entre as diferentes espécies de fungos e mesmo de uma linhagem para outra na mesma espécie, e podem ser influenciadas pela sua atividade enzimática, incluindo lipases, quitinases e proteases, que é fundamental no processo de infecção para a penetração na cutícula do inseto e que é expressa a partir da germinação dos conídios (Boucias *et al.*, 2000, El-Sayed *et al.*, 1993; Nunes *et al.*, 2010).

Dentre os fungos patogênicos, destacam-se *Metarhizium* spp., *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* e *Nomuraea rileyi*, sendo os lepidópteros os hospedeiros preferenciais deste último (Alves, 1998; Carruthers, 1991; Ibrahim *et al.*, 1999; Wraight *et al.*, 2010).

N. rileyi, especificamente, é um fungo patogênico cosmopolita que infecta naturalmente larvas de várias espécies que atacam algumas culturas de importância econômica em muitas regiões do mundo. Seus hospedeiros são basicamente lepidópteros, apresentando uma certa preferência por representantes da Superfamília Noctuoidae (Ignoffo *et al.*, 1975; Suwannakut *et al.*, 2005).

Pesquisas com *N. rileyi* vêm sendo realizadas visando seu emprego no controle de lepidópteros-praga desde a década de 70, quando seu potencial passou a chamar a atenção devido à epizootias em lavouras de soja (Ignoffo *et al.*, 1975; Puttler *et al.*, 1976). Atualmente esforços têm sido direcionados para elucidação de características moleculares, bioquímicas e nutricionais (Vargas *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2010; Noda *et al.*, 2011), além de outros aspectos como produção massal, conservação e viabilidade de formulações (Thakre *et al.*, 2011; Torres & Cotes, 2005; Vega-Aquino *et al.*, 2010).

Estudos envolvendo rDNA mitocondrial demonstraram que *N. rileyi* apresenta pouca variabilidade genética e é muito próximo dos representantes do gênero *Metarhizium* (Boucias *et al.*, 2000; Sosa-Gómez *et al.*, 2009). Além disso, a diversidade de *N. rileyi* está mais relacionada com a espécie hospedeira do que com a localização geográfica, conforme demonstrado em estudos genéticos (Boucias, *et al.*, 2000; Suwannakut *et al.*, 2005).

N. rileyi é conhecido por atacar larvas de diversos lepidópteros como *A. gemmatalis* e vários noctuídeos como *Heliothis zea*, *H. virescens*, *S. frugiperda*, entre outros (Ignoffo *et al.*, 1976; Sosa-Gómez & Silva, 2002; Mohamed & Nelson 1984; Vimala Devi *et al.*, 2003). Sua atividade enzimática parece ser estimulada em meios com presença de substrato cuticular de *A. gemmatalis* em comparação a outros substratos (Nunes *et al.*, 2010) e estudos demonstram existir grande variação entre linhagens e entre hospedeiros (Boucias *et al.*, 2000; Suwannakut *et al.*, 2005) além

de uma certa especificidade, apresentando alta virulência quando empregados contra o hospedeiro original e atividade reduzida em outras espécies (Moscardi *et al.*, 1992).

O período entre o contato inicial do patógeno com o hospedeiro, o desenvolvimento do processo infectivo e a morte do inseto dura em média 6 a 8 dias (Srisukchayakul *et al.*, 2005), variando conforme o isolado e a espécie hospedeira envolvida, sendo que grande variabilidade é descrita entre isolados de *N. rileyi* (Boucias *et al.*, 2000; Ignoffo & Boucias, 1992; Morrow & Boucias, 1988)

Em estudos recentes, Noda *et al.* (2010a; 2010b; 2011), identificaram D-eritro-C14-esfingosina como fator de aceleração da germinação conidial de *N. rileyi* a partir de *Bombix mori* e que co-fatores nitrogenados desencadeiam a germinação, sugerindo que as condições requeridas para germinação conidial não são apenas ambientais (Boucias & Pendland 1982; Kumar *et al.*, 1997), mas também nutricionais, que parecem ser mais complexas que em outros fungos entomopatogênicos (Boucias *et al.*, 2000; Boucias & Pendland 1984).

Embora em alguns fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* e *B. bassiana* a ocorrência e ação de toxinas sejam bem conhecidas (Roberts, 1981), em *N. rileyi* apenas um peptídio tóxico foi caracterizado (Onofre *et al.*, 2002) e um outro composto foi identificado a partir de larvas de *Spodoptera litura* infectadas, o peróxido de ergosterol (Prompiboon *et al.*, 2008).

Sendo *N. rileyi* um entomofungo, o tegumento dos insetos é a primeira barreira de proteção de qualquer potencial hospedeiro. Este tegumento evita a dessecação e funciona como uma significativa barreira ao meio externo e, conseqüentemente à penetração dos fungos entomopatogênicos (Lockey, 1985; 1988; Clarkson & Charnley, 1996).

O tegumento é formado pela epiderme e pela cutícula. A compreensão dos mecanismos de formação, diferenciação, estrutura e composição dessas diferentes camadas têm sido objetos de diversos estudos, principalmente relacionados a lipídios e proteínas (Lockey, 1985; 1988; Andersen *et al.*, 1995; Gibbs, 1995; Moussian, 2010; Andersen, 2011).

Os lipídios são os constituintes principais da cutícula (Guo & Blomquist, 1991) encontrando-se lipídios estruturais e lipídios livres. Os estruturais são lipoproteínas e ocorrem em toda a cutícula, sendo insolúveis em solventes orgânicos, podendo ser extraídos por oxidação destrutiva, já os lipídios livres consistem principalmente de compostos alifáticos polares e apolares e ocorrem na epicutícula, podendo ser extraídos por solventes orgânicos. A composição dos lipídios cuticulares livres varia nas espécies e pode incluir ácidos graxos, álcoois, ésteres, glicerídeos, esteróis, cetonas e hidrocarbonetos (Lockey, 1988; Nelson & Blomquist, 1995).

Diversas funções estão relacionadas aos lipídios cuticulares: proteção contra dessecação; reconhecimento; atração sexual; afetam a absorção de produtos químicos e a penetração da cutícula

por micro-organismos; mimetismo químico, entre outras (Nelson & Blomquist, 1995), sendo que a proteção contra micro-organismos ocasionada pelos lipídios cuticulares pode ser tanto de origem física como química (Koidsumi, 1957).

Análises da composição de lipídios cuticulares vem sendo realizadas em diversas espécies, desde hemípteros como o percevejo verde da soja (Sosa-Gómez et al., 1997), coleópteros (Golebiowski et al., 2008a), Thysanoptera (Golebiowski et al., 2007) e mais especificamente de ácidos graxos cuticulares em espécies de lepidópteros e dípteros (Golebiowski et al., 2008b; 2011). Compostos lipídicos podem influenciar a adesão conidial na cutícula do inseto através de forças hidrofóbicas (Lord & Howard, 2004) e também apresentar efeitos inibidores sobre o crescimento fúngico (St. Leger et al., 1988). Ácidos graxos cuticulares tem forte efeito sobre a germinação e diferenciação de esporos de fungos, podendo ser tóxicos, fungistáticos, ou ocasionalmente estimulantes para algumas espécies patogênicas, e a determinação do perfil de ácidos graxos cuticulares é de grande importância para compreender a susceptibilidade dos insetos à infecção fúngica (Golebiowski et al., 2008b; 2011).

Outro aspecto relevante é a superfície cuticular e sua ornamentação que, junto com sua composição química, pode contribuir de maneira decisiva na defesa e proteção do inseto, tanto por efeito mecânico, influenciando a adesão de partículas estranhas como conídios de patógenos, por exemplo, como por forças hidrofóbicas, atraindo ou repelindo estas partículas (Boucias et al., 1988). Este aspecto já foi explorado em larvas de *Trichoplusia ni* infectadas com *Nomuraea rileyi* com uso de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (Ignoffo, 1981).

O complexo natural de resistência dos insetos sugere uma ação sinérgica de várias enzimas como críticas no processo de infecção do hospedeiro (Clarkson & Charnley, 1996). Níveis mínimos de lipases foram detectados sobre substratos de *Trichoplusia ni*, *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens* e este fato foi atribuído à liberação de indutores que são gerados pela ação anterior de outras enzimas como proteases e quitinases (El-Sayed et al., 1993).

A susceptibilidade ou resistência de várias espécies de insetos à invasão fúngica podem resultar de vários fatores, incluindo aspectos comportamentais (Yanagawa et al., 2008) diferenças na estrutura e composição do exoesqueleto, a presença de compostos anti-fúngicos na cutícula (Lord & Howard, 2004; Sosa-Gómez et al., 1997), bem como a eficiência das reações de defesa celular e humoral dos insetos invadidos (Boucias & Pendland, 1987). Diferenças na composição e estrutura cuticular podem influenciar a germinação conidial, resultando em susceptibilidade diferenciada das várias espécies de insetos à patógenos, e desta forma, um fungo pode ser altamente patogênico para determinada espécie e não o ser para outra (Golebiowski et al., 2008b).

Diante destes aspectos, é de grande interesse elucidar algumas questões relacionadas com a susceptibilidade diferencial de alguns lepidopteros ao fungo *N. rileyi*, visto que espécies como *A. gemmatalis* e plusiíneos em geral são susceptíveis, enquanto outras, como por exemplo, *S. cosmioides* não são infectadas pelo patógeno (Sosa-Gómez & Silva, 2002; Humber et al., 2011). O conhecimento da estrutura e composição cuticular das lagartas destas espécies poderá trazer novas perspectivas e ajudar a esclarecer cientificamente o processo de interação patógeno-hospedeiro, considerando aspectos físicos e químicos da cutícula das larvas, que constituem a fase suscetível ao fungo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados na forma de capítulos, cada um deles correspondente a um artigo, conforme descrito a seguir:

3.1 Capítulo 1: Identification of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate from the cuticle of soybean pods armyworm (*Spodoptera cosmioides*)

Nota científica publicada no periódico Natural Product Research

3.2 Capítulo 2: Concentração de vitamina E na composição cuticular de larvas (Lepidoptera, Noctuoidea) e sua relação com resistência à infecção por *Nomuraea rileyi*

Nota a ser submetida ao periódico Naturwissenschaften

3.3 Capítulo 3: Superfície e composição lipídica cuticular de larvas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* e sua possível influência na susceptibilidade diferencial a *Nomuraea rileyi*

A ser submetido ao periódico Journal Invertebrate Pathology

3.4 Capítulo 4: Superfície e composição lipídica cuticular larval de *Mythimna sequax* e *Rachiplusia nu* e susceptibilidade à *Nomuraea rileyi*

A ser submetido ao periódico Mycopathologia

3.5 Capítulo 5: Espécies hospedeiros de *Nomuraea rileyi* e seu potencial como biopesticida: fronteiras e perspectivas

A ser submetido ao periódico Biological Control

Capítulo 1

Natural Product Research, 2013
http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2012.763125



SHORT COMMUNICATION

Identification of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate from the cuticle of soybean pods armyworm (*Spodoptera cosmioides*)

Edegar Fronza^{a*}, Ignacio Miguez^b, Alexandre Specht^c, Neiva Monteiro de Barros^a and Horacio Heinzen^b

^aLaboratório de Controle de Pragas, Instituto de Biotecnologia – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas, Caixa Postal 1352, CEP 95070-560, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil; ^bFacultad de Química, Catedra de Farmacognosia, Universidad de la Republica, Av. General Flores, 118000 Montevideo, Uruguay; ^cEmbrapa-Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, CEP 73310-970, Planaltina, DF, Brazil

(Received 1 August 2012; final version received 4 December 2012)

The chemical composition of the soybean pods armyworm *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) larval cuticles was evaluated using gas chromatography coupled to a mass detector (GC-MS). Among the usual lipids found in the insect cuticle, α -tocopherol and α -tocopheryl acetate were also isolated from *S. cosmioides*. On the other hand, no vitamin E derivative was found in *A. gemmatilis* exuvia. This is the first report of vitamin E occurrence in the insect's cuticle.

Keywords: antioxidant; tocopherol; larval exuviae; Lepidoptera

1. Introduction

The insect cuticle comprises an exoskeleton embedded in a complex hydrophobic mixture of long chain alkyl compounds, such as hydrocarbons, fatty alcohols, fatty acids, long chain ketones and other chemical functionalities. The cuticle chemical composition depends on the development stage of the insect as well as on its taxonomic group (Golebiowski et al. 2007; Golebiowski, Malinski, Bougus, et al. 2008; Golebiowski, Malinski, Nawrot, et al. 2008; Golebiowski et al. 2010). The cuticle is the border/boundary between the insects and its environment, protecting them primarily against desiccation and temperature changes (Nelson & Lee 2004). Alkanes, wax esters, free fatty acids among other structures are commonly found in cuticular lipids of Orthoptera, (Soliday et al. 1974), Coleoptera (Baker et al. 1979) and Lepidoptera (Guo & Blomquist 1991). The chemical and physical characterisation of the insects cuticle are important issues for a better understanding of insects' evolutionary aspects, their environmental adaptation and communication cues as well as their resistance to pathogens.

Entomopathogenic fungi are those capable to colonise insects leading to their death at different developmental stages (Alves 1998). Usually, the fungal pathogenicity is limited to a family of insects, but it could be also species dependent, being harmless for other living organisms or beneficial insects. This fact turns the use of such fungi as an interesting alternative to control agricultural pests. Several strains of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) and other fungi are being increasingly used to protect crops from insect plagues,

*Corresponding author. Email: fronzabio@yahoo.com.br

such as lepidopteran caterpillars. Two of the most common pests of soybean, the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Erebidae) and the soybean pods armyworm *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) show different susceptibility towards the entomopathogenic fungus *N. rileyi*. Although the former is severely attacked by the fungi, the latter lepidopteran species is not affected by natural epizooties of *N. rileyi* (Sosa-Gomez & Silva 2002). Previous reports stressed the relationship between cuticle chemical composition and the insect resistance to pathogens (Golebiowski, Malinski, Bougus, et al. 2008). Therefore, differences between the cuticle chemical compositions of the soybean pods armyworm *S. cosmioides* and *A. gemmatalis* larvae could explain the observed behaviour towards *N. rileyi*.

The present communication aims to contribute to a better comprehension of differential pathogen–insect interactions, through the comparison of the exuvia's lipid composition from both larvae.

2. Results and discussion

Exhaustive extraction of *S. cosmioides* and *A. gemmatalis* exuviae reared over the same artificial diet using organic solvents followed by open column chromatography fractionation yielded several fractions. GC-MS analysis of the obtained fractions showed the presence of compounds similar to those already described in the literature for lepidopteran larvae, such as alkanes (C_nH_{2n+2}) ($n =$ from 15 to 32) belonging to the iso and anteiso series, alcohols and fatty acids (data not shown) (Guo & Blomquist 1991; Nelson & Blomquist 1995). The difference between the lipidic composition of both exuviae was the presence of vitamin E and its acetate in the *S. cosmioides* extract. This finding was confirmed after comparison with commercial MS libraries (Figure 1). To the best of our knowledge, both compounds have not been reported in lepidopteran larval cuticles. Vitamin E and its acetate were not detected within *A. gemmatallis* cuticular lipids.

The beneficial biological effects of vitamin E to different organisms have been widely reported (Cerqueira et al. 2007). The presence or absence of vitamin E in the diet can interfere with the biological and reproductive aspects of *Pimpla turionellae* (Schmiedeknecht, 1888) (Hymenoptera) as demonstrated by Coskun et al. (2005). Precursor compounds of vitamin E have been reported in *Epilachna borealis* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Coccinellidae) by Attygalle et al. (1996), who have also demonstrated that beetles from this species can produce α -tocopheryl acetate from α -tocopherol obtained from their diet. Nevertheless, there are few reports on vitamin E isolation from insects.

N. rileyi is an entomopathogenic fungus that infects many lepidopteran species, and it is used to control some major soybean plagues, as the soybean caterpillar, *A. gemmatalis* (Alves 1998). However, *S. cosmioides* has not been reported as a natural host for *N. rileyi* (Sosa-Gomez & Silva 2002) and it is not affected by the fungi at the different larval developmental stages. This fact leads to speculate that the presence of the well-known antioxidant vitamin E can be involved in *S. cosmioides* natural resistance towards the fungus, as one of the proposed mechanisms of *N. rileyi* pathogenicity is the breakdown of the larval cuticle through the generation of ergosterol peroxide (Prompiboon et al. 2008). On the other hand, lack of vitamin E within the cuticle could explain the susceptibility of *A. gemmatallis* larvae to *N. rileyi*.

3. Experimental

3.1 Biological material

The biological material was obtained from larvae grown and reproduced at the Biological Plague Control Laboratory, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil, under controlled conditions (25°C, 70% relative humidity and 12 h photo phase) in individual

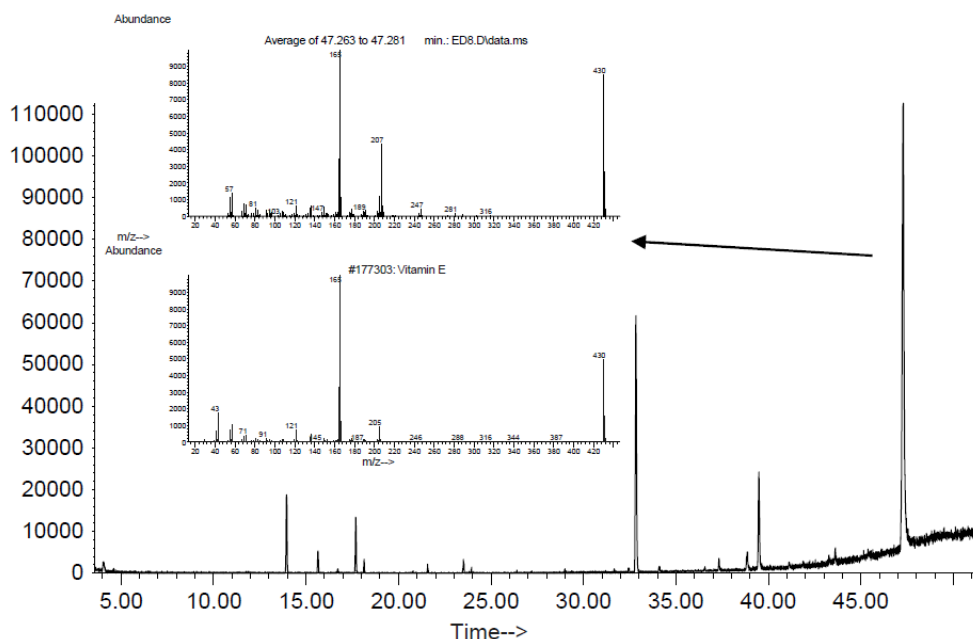


Figure 1. GC-MS chromatogram of vitamin E containing fraction, and MS of the peak at 47 min compared with the NIST[®] library spectra.

cages. *A. gemmatalis* and *S. cosmioides* larvae were fed with artificial diet (Greene et al. 1976) until they reached the adult stage. After the last ecdysis, the larval cuticles were collected discarding the cephalic capsules. The exuviae were washed three times with distilled water and stored at -18°C .

3.2 Chemical analysis

The exuviae (2.0 g) were stirred with dichloromethane–methanol (2:1) for 1 h and macerated for another 19 h in repose. The obtained extract was dried under reduced pressure at 40°C , taken up with ethyl acetate and analysed by thin layer chromatography (TLC) using silica gel 60F254 Merck (Darmstadt, Germany) plates and fractionated by open column chromatography using a 100 mm \times 6 mm silica column. The obtained fractions were analysed by TLC and GC-MS (HPGC 6890 MJ5973, HP-S 30 m column ID 0.25 m and programme rate: $150\text{--}280^{\circ}\text{C}$, $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Tocopherol and tocopheryl acetate were isolated and identified using the NIST 05a. Library (SI: 97% and 94%, respectively).

4. Conclusions

Among many other compounds present in *S. cosmioides* larval cuticle, α -tocopherol and α -tocopheryl acetate were identified. None of them could be found in the exuviae of *A. gemmatalis* which is susceptible to *N. rileyi*. The function of vitamin E within *S. cosmioides* cuticle remains uncertain, but due to its antioxidant properties it can be related to the insect resistance to entomopathogenic fungi.

Acknowledgements

This work was financially supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Comissão Aperfeiçoamento de Pessoal (Capes) and Universidad de la Republica (UdelaR), Bilateral Cooperation Project No. 022/2010.

References

- Alves, S.B. (1998). Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B., editor. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ. p. 289–381.
- Attygalle, A.B., Meinwald, J., Rossini, C., Eisner, T. (1996). Acetylation of α -tocopherol by the squash beetle, *Epilachna borealis* defense mechanisms of arthropods, 134 [1]. *Naturwissenschaften*. 83(6):277–279. doi: 10.1007/s001140050287.
- Baker, J.E., Sukkestad, D.R., Nelson, D.R., Fatland, C.L. (1979). Cuticular lipids of larvae and adults of the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*. *Insect Biochem*. 9:603–611.
- Cerqueira, F.M., Medeiros, M.H. G., Augusto, O. (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química nova*. 30(2):441–449.
- Coskun, M., Ozalp, P., Emre, I. (2005). Effects of Vitamin E concentrations on sex ratio of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) adults. *Physiol Biochem Toxicol*. 98(3):336–339.
- Golebiowski, M., Bogus, M.I., Paszkiewicz, M., Stepnowski, P. (2010). The composition of the free fatty acids from *Dendrolimus pini* exuviae. *J Insect Physiol*. 56(4):391–397. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.11.009.
- Golebiowski, M., Malinski, E., Bougus, M., Kumirska, J., Stepnowski, P. (2008). The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. *Insect Biochem Mol Biol*. 38:619–627. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.03.005.
- Golebiowski, M., Malinski, E., Nawrot, J., Stepnowski, P. (2008). Identification and characterization of surface lipid components of the dried-bean beetle *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res*. 44(4):386–388. doi: 10.1016/j.jspr.2008.02.010.
- Golebiowski, M., Malinski, E., Nawrot, J., Szafranek, J., Stepnowski, P. (2007). Identification of the cuticular lipid composition of the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 147(2):288–292. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.01.016.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J Econ Entomol*. 64(4):487–488.
- Guo, L., Blomquist, G.J. (1991). Identification, accumulation, and biosynthesis of the cuticular hydrocarbons of the southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch Insect Biochem Physiol*. 16(1):19–30. doi: 10.1002/arch.940160104.
- Nelson, D.R., Blomquist, G.J. (1995). Insect waxes. In: Hamilton, R.J., editor. *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. Vol. 6. Dundee: The Oily Press Lipid Library. p. 349.
- Nelson, D.R., Lee, R.E., Jr. (2004). Cuticular lipids and desiccation resistance in overwintering larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*. 138(3):313–320. doi: 10.1016/j.cbpc.2004.04.013.
- Prompi boon, P., Bhumiratana, A., Ruchirawat, S., Boucias, D.G., Wiwat, C. (2008). Isolation of ergosterol peroxide from *Nomuraea rileyi* infected larvae of tobacco cutworm. *World J Microbiol Biotechnol*. 24(12):2909–2917. doi: 10.1007/s11274-008-9830-3.
- Soliday, C.L., Blomquist, G.J., Jackson, L.L. (1974). Cuticular lipids of insects. VI. Cuticular lipids of the grasshoppers *Melanoplus sanguinipes* and *Melanoplus packardii*. *J Lipid Res*. 15:399–405.
- Sosa-Gomez, D.R., Silva, J.J. (2002). *Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados*. Londrina: Embrapa Soja.

Capítulo 2

Edegar Fronza^a, Alexandre Specht^b, Janaína Katia Cavazzola^a, María Verónica Cesio^c, Horacio Heinzen^c, Neiva Monteiro de Barros^a

Concentration of vitamin E in the cuticle of caterpillars (Lepidoptera, Noctuoidea) and its relationship with resistance to infection by *Nomuraea rileyi*

^aLaboratório de Controle de Pragas, Instituto de Biotecnologia – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, Caixa Postal 1352, CEP 95070-560 Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. fronzabio@yahoo.com.br

^bEmbrapa-Cerrados BR 020 Km 18,- Caixa Postal: 08223 CEP 73310-970, Planaltina, DF – Brazil.

^cFacultad de Química, Catedra de Farmacognosia, Universidad de la Republica, Av. General Flores, 118000. Montevideo, Montevideo, Uruguay.

Abstract

Cuticular lipids may be associated with insect resistance to pathogens. Lepidopteran larvae with variable levels of susceptibility to the entomofungus *Nomuraea rileyi* can synthesize, and store, different amounts of vitamin E together with their cuticular lipids. By contrast, the cuticular lipids of *Anticarsia gemmatalis*, which is highly susceptible to the fungus, lack this vitamin. In this study we evaluated quantitatively the presence of vitamin E in the cuticle of three lepidopterans, *Rachiplusia nu*, *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera cosmioides*. We also supplemented the diet of *A. gemmatalis* caterpillars with this vitamin, to ascertain whether it decreases their susceptibility to *N. rileyi*. Despite the fact that the caterpillars of the three species were given a similar diet, the proportion vitamin E in their cuticles varied greatly. The intake of vitamin E did not reduce the susceptibility of *A. gemmatalis* caterpillars to the fungus. The vitamin was found in their feces, suggesting that these larvae cannot metabolize it. Differences in the metabolic pathways of the species studied may be related to the lipid composition of their cuticles and hence to their susceptibility to entomopathogenic fungi.

Key-words: Lepidoptera; metabolism; *Nomuraea rileyi*; susceptibility; vitamin E.

Introduction

The cuticle is the most important protective barrier of insects against microorganisms. Even though the exoskeleton of immature lepidopterans is not yet fully covered with chitin, their exocuticle is still the main barrier between their internal and external environments, performing different functions. The insect cuticle includes a complex mixture of lipids, which may be almost exclusively composed by hydrocarbons, or hydrocarbons in various amounts combined with aldehydes, alcohols, and other components (Lockey 1985, 1988; Nelson and Blomquist 1995; Pedrini 2007).

In insects, cuticular lipids may be involved in the susceptibility to entomopathogenic fungi, either by offering a physical barrier or through chemical pathways (Koidsumi 1957; El-Sayed et al. 1991; Golebiowski et al. 2008; Jarrold et al. 2007), for example from some specific type of lipid such as fatty acids or fatty amides (Lord and Howard, 2004;

Golebiowski et al. 2011). The fungus *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) is amongst the most important pathogens in the control of caterpillars of several species, including the key pest of several crops (Alves 1998). However, the susceptibility of lepidopteran hosts to this pathogen is variable, especially in terms of families and subfamilies (Boucias et al. 2000; Suwannakut et al. 2005).

Among the host species of *N. rileyi* in South America are the following Noctuoidea: the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Erebidae, Eulepidotinae) and the South American semilooper, *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) (Noctuidae, Plusiinae) (Suwannakut et al. 2005; Bueno et al. 2012). In favorable, natural conditions, these species and other Plusiinae are controlled naturally by the epizootic *N. rileyi* (Bueno et al. 2012; Boucias et al. 1982). On the other hand, *N. rileyi* has seldom been isolated from representatives of armyworms (*Spodoptera* spp.) and cutworms (*Agrotis* spp.) (Noctuidae: Noctuinae) (Sosa-Gómez and Silva 2002).

Recently, the presence of vitamin E, a terpenoid antioxidant that insects and other animals have to obtain from their diet, and which provides protection against Reactive Oxygen Species (ROS), was identified between the cuticular lipids of the soybean pods armyworm, *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858), a species that is not very susceptible to *N. rileyi*; by contrast, the vitamin was not found in the cuticle of *A. gemmatalis* (Fronza et al. 2013), a highly susceptible species.

We hypothesize that the susceptibility of larvae to infection by *N. rileyi* is associated with the presence and the amount of Vitamin E in their cuticles. The vitamin most likely hampers one of the fungal pathogenicity mechanisms when interacting with ergosterol peroxide, a fungal compound. If this hypothesis holds true, less susceptible species will have greater amounts of vitamin E in their cuticles, whereas more susceptible species, for instance *A. gemmatalis*, will have little to none. In this work, we assessed the presence and quantified the amounts of vitamin E with respect to other cuticular lipids in two species that are not very susceptible [*S. cosmioides* and the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766)], and one species that is highly susceptible (*R. nu*). Furthermore, we tested the addition of different concentrations of vitamin E in the artificial diet of *A. gemmatalis* larvae to verify whether they metabolize it and acquire greater protection against *N. rileyi* as a result.

2. Materials

2.1 Biological material

In the experiments, we reared *A. gemmatalis*, *A. ipsilon*, *S. cosmioides* and *R. nu* in the Laboratory of Pest Control of the Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil. The larvae were maintained at 25°C, 70 % RH and 12 h photophase and fed Greene's artificial diet (Greene et al. 1976.), except *A. ipsilon*, which received an adaptation of the Greene's diet (Bento et al. 2007). In order to perform the bioassay with *A. gemmatallis*, 0.75, 1.5 and 2.25mg of α -tocopherol were added to 4000g of diet.

2.2. Lipid Analysis

We analyzed exuviae extract of *A. ipsilon* (1.57g) and *R. nu* (1.44g). The exuviae were washed three times with distilled water. The head capsule was discharged, and the remaining material was stored at -18 °C. The methodology for analysis and the data pertaining *S. cosmioides* and *A. gemmatallis* followed Fronza et al. (2013). The quantification of the compounds was performed considering the area of the peaks corresponding to the compounds relative to the total area of all peaks obtained.

2.3 Effects of the addition of Vitamin E in the diet of *A. gemmatalis*

Second instar *A. gemmatalis* larvae, which from birth were fed an artificial diet supplemented with 0.75, 1.5 and 2.25 mg vitamin E/kg diet were exposed to a suspension of 10^8 conidia/ml *N. rileyi* (strain CH87551). A total of 545 larvae were used: 45 in the control, which received a diet without the vitamin, and 100 larvae per treatment, which consisted of: diet supplemented with vitamin E at 1.5mg/kg diet, normal diet+ fungus and diet + vitamin at (0.75, 1.5 and 2.25mg/kg) + fungus. The bioassay was conducted under the same controlled conditions as the rearing, and was evaluated for 14 days, until the larvae reached the pupal stage. Feces of larvae fed an enriched diet, and which were not used in the bioassays, were subjected to hexane extract and analyzed by GCMS, following the same methodology described for the analysis of cuticular lipids (Fronza et al., 2013).

3. Results and discussion

As previously described for *S. cosmioides*, vitamin E was detected in the cuticle of *R. nu* and *A. ipsilon*. After we quantified this vitamin, we noticed that the data were quite variable. For instance, in *S. cosmioides*, Vitamin E is the most abundant compound among the cuticular lipids, whereas in *R. nu* and *A. ipsilon* it is present in small amounts in terms of percentages, while in absolute numbers, the amount per individual is about 18 times higher in *A. ipsilon* than in *R. nu*. The amount of this vitamin in *A. ipsilon* represents approximately 28 % of the amount found in *S. cosmioides* (Table 1).

Table 1: Susceptibility of the lepidopteran larvae studied to *N. rileyi*, and their cuticular α -tocopherol content.

Species	Susceptibility to <i>N. rileyi</i>	% Vit. E ^a	$\mu\text{g vit E/insect}$
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	+++	nd	nd
<i>Agrotis ipsilon</i>	--	1.17	55.54
<i>Rachiplusia nu</i>	++	2.48	3.06
<i>Spodoptera cosmioides</i>	--	70.86	198.2

^a % of the total cuticular lipids identified. nd: not detected

Given that the diets offered are very similar in terms of ingredients, the presence of Vitamin E among the cuticular lipids of *A. ipsilon*, *R. nu* and *S. cosmioides*, and its absence in *A. gemmatalis* suggests that these species have different metabolic pathways, which result in different capacities to metabolize or accumulate the vitamin. It has been already demonstrated that in *Epilachna borealis* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Coccinellidae) (Attygalle et al. 1996) the precursors of vitamin E are obtained from the diet; and the influence of this vitamin on the biological and reproductive aspects of other species has been demonstrated (Coskun et al. 2005). Alpha-tocopherol is present in wheat germ, but the metabolism and accumulation of it in the cuticle does not occur in all species that eat the same diet, or which contain the some common components. Moreover, only *S. cosmioides* is able to build up a pool of vitamin E where not only the free compound is deposited in the cuticle, but also its acetate, providing a fast-track access to free tocopherol, the vitamin's bioactive form. While attacking the insect, the fungus produces a number of enzymes, some of which lipases, which could also free the radical scavenger and increase, in a particular point of the larval cuticle, the concentration of vitamin E.

When pure vitamin E was added to the diet of *A. gemmatalis* caterpillars, it did not alter their resistance to the pathogen, suggesting that either this compound is not absorbed, or that it is absorbed and deposited in the larval cuticle, but some other factor suppresses its protective effects. However, vitamin E was detected in the analysis of larval feces, indicating that this compound is not either not metabolized, or that it is metabolized in very small quantities.

Insects' ability to store semiochemicals obtained from their diets has been well documented as a defensive strategy, especially in Lepidoptera (Nishida 2002). If the sequestration and subsequent acetylation of vitamin E is one of

the factors that decrease the susceptibility of lepidopteran larvae to entomopathogenic fungi, the effectiveness of the vitamin must be related to the high amounts present in the cuticle, since the compound also appears in the susceptible *R. nu*, though in smaller quantities (Sosa-Gómez and Silva 2002). It has been shown that different species have distinct metabolic pathways, and the accumulation of vitamin E may be an important factor in their susceptibility to pathogens. It is possible that the role of vitamin E includes facilitating the formation and accumulation, in the cuticle, of other compounds that have a more direct effect on the development of the pathogen (Pedrini et al. 2007, 2013; Golebiowski et al. 2011).

In addition to the qualitative and quantitative structure of cuticular lipids, the differential susceptibility among species of Lepidoptera may also be associated with the virulence of the pathogen, since several studies have demonstrated that different strains of *N. rileyi* affect different host species differently, tending to be more active against the species from which they were isolated (Boucias et al. 2000; Suwannakut et al. 2005).

4. Conclusions

The proportion of vitamin E in the lipid composition of the larval cuticle varied from 0% to over 70% in the four species of Noctuoidea.

The addition of Vitamin E to the diet of *A. gemmatalis* did not result in a decreased susceptibility to the fungus *N. rileyi*, indicating the inability of the larvae to store vitamin E within their cuticular lipids.

The amounts of vitamin E per insect in the cuticle of non-susceptible species to *N. rileyi* range from 55µg (*A. ipsilon*) to 198µg (*S. cosmioides*) but the susceptible *R.nu* stores only 3µg of it, indicating a concentration dependent protective effect. Differences in the metabolic pathways of the species studied may be related to the lipid composition of their cuticles and hence to their susceptibility to entomopathogenic fungi.

Acknowledgements

We thank CNPq, for the scholarship (Process 147526/2010-8); CAPES (Edital CGCI 29/2009 - Convocatória Programa Capes/Udelar Projetos) and Universidad de la Republica de Uruguay - UdelaR.

References

- Alves SB (1998). Fungos entomopatogênicos. In: Alves SB (ed) Controle microbiano de insetos. FEALQ, Piracicaba, pp. 289-381.
- Attygalle AB, Meinwald J, et al. (1996). Acetylation of a-Tocopherol by the Squash Beetle, *Epilachna borealis* Defense Mechanisms of Arthropods, 134 [1]. *Naturwissenschaften* 83(6):277-279. doi 10.1007/s001140050287
- Bento FdMM, Magro SR, et al. (2007). Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Agrotis ipsilon* em dieta artificial. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42(10):1369-1372
- Boucias DG, Schoborg EA, et al. (1982). The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsa gemmatalis*. *J. Invertebr. Pathol.* 39(2):238-240. doi 10.1016/0022-2011(82)90017-9
- Boucias DG, Tigano MS, et al. (2000). Genotypic Properties of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi*. *Biol. Control.* 19:124-138. doi10.1006/bcon.2000.0857
- Bueno AF, Sosa-Gomez DR, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F, Bueno RCOF (2012). Inimigos naturais das pragas da soja. In: Hoffmann-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (Org) SOJA: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga. 1ed, Embrapa, Brasília, DF, pp 493-630.

- Coskun M, Ozalp P, et al. (2005). Effects of Vitamin E concentrations on sex ratio of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) adults. *Physiol. Biochem. Toxicol.* 98(3):336-339
- El-Sayed GN, Ignoffo CM, et al. (1991). Effects of cuticle source and concentration on germination of conidia of two isolates of *Nomuraea rileyi*. *Mycopathol.* 113:95-102
- Fronza E, Migues I, et al. (2013). Identification of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate from the cuticle of soybean pods armyworm (*Spodoptera cosmioides*). *Nat. Prod. Res.* 1-4. doi 10.1080/14786419.2012.763125
- Gołębowski M, Boguś MI, et al. (2011). Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 399(9):3177-3191. doi 10.1007/s00216-010-4439-4
- Golebiowski M, Malinski E, et al. (2008). The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38:619-627. doi 10.1016/j.ibmb.2008.03.005
- Greene GL, Leppla NC, et al. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 64(4):487-488
- Jarrold SL, Moore D, et al. (2007). The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol. Res. (III)*:240-249. doi 10.1016/j.mycres.2006.10.007
- Koidsumi K (1957). Antifungal action of cuticular lipids in insects. *J. Insect Physiol.* 1(1):40-51. doi 10.1016/0022-1910(57)90022-7
- Lockey KH (1985). Insect cuticular lipids. *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.* 81(2):263-273. doi 10.1016/0305-0491(85)90311-6
- Lockey KH (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. B: Com. Biochem.* 89(4):595-645. doi 10.1016/0305-0491(88)90305-7
- Lord JC and Howard RW (2004). A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathol.* 158:211-217
- Nelson DR and Blomquist GJ (1995) Insect waxes. In: Hamilton RJ (ed) *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. The Oily Press Lipid Library, Dundee, Scotland, pp. 349.
- Nishida R (2002). Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 47:57-92
- Pedrini N, Crespo R, et al. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 146(1-2): 124-137. doi 10.1016/j.cbpc.2006.08.003
- Pedrini N, Ortiz-Urquiza, A, et al. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* doi 10.3389/fmicb.2013.00024.
- Promptboon P, Bhumiratana, A, et al. (2008). Isolation of ergosterol peroxide from *Nomuraea rileyi* infected larvae tobacco cutworm. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 2909-2917
- Sosa-Gómez DR and Silva JJ (2002) *Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados*. Embrapa Soja, Londrina.
- Suwannakut S, Boucias DG, Wiwat C (2005). Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 90:169-176. doi 10.1016/j.jip.2005.08.010

Capítulo 3

Superfície e composição lipídica cuticular de larvas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* e sua influência na susceptibilidade diferencial a *Nomuraea rileyi*

Edegar Fronza^{a*}, Alexandre Specht^b, Janaíne Katia Cavazzola^a, Aline Buseti^a, Horácio Heinzen^c, Marília Santos Silva^d, Neiva Monteiro de Barros^a

^aLaboratório de Controle de Pragas, Instituto de Biotecnologia – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas, Caixa Postal 1352, CEP 95070-560 Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. fronzabio@yahoo.com.br.+55 (54) 32182149

^bEmbrapa-Cerrados BR 020 Km 18,- Caixa Postal: 08223 CEP 73310-970, Planaltina, DF – Brazil.

^cFacultad de Química, Catedra de Farmacognosia, Universidad de la Republica, Av. General Flores, 118000. Montevideo, Montevideo, Uruguay.

^dEmbrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final) Caixa Postal: 02372 CEP 70770-917, Brasília, DF - Brasil

* Autor correspondente

Resumo

Nomuraea rileyi é um entomopatógeno cujos hospedeiros preferenciais são larvas de lepidópteros, no entanto, a patogenicidade difere entre as espécies. O objetivo deste trabalho foi comparar a susceptibilidade de lagartas de segundo ínstar de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* à duas linhagens de *N. rileyi* (CH87551 e UB93150) relacionando com a estrutura da superfície e a composição de lipídios da cutícula das larvas. No oitavo dia após a aplicação as larvas de *A. gemmatalis* se mostraram suscetíveis a ambos as linhagens, sem diferenças estatísticas para valores de CL₅₀ [log dose 6,733 e 7,969]. Entretanto, nas mesmas condições, nenhuma concentração e linhagem matou mais de 11,5% das larvas de *S. cosmioides*. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da cutícula de larvas de segundo instar de ambas as espécies indicaram a presença de conídios de *N. rileyi* após 24, 48 e 72 horas. As imagens revelaram diferenças na superfície cuticular das lagartas observando-se que em *A. gemmatalis*, os conídios aparentemente germinaram em direção ao interior da larva, enquanto em *S. cosmioides* tubos germinativos foram observados crescendo paralelamente à superfície cuticular, sem penetrar no corpo da larva. A análise da composição lipídica da cutícula revelou diferenças quali-quantitativas entre os hidrocarbonetos das duas espécies. Em *A. gemmatalis* constituem a maior parte (72,3%) dos lipídios

cuticulares, sem a presença de vitamina E, enquanto que em *S. cosmioides*, representam apenas 20,5% e o principal componente é a vitamina E (70,86%). Considerando que as lagartas de ambas as espécies apresentaram conídios aderidos à superfície da cutícula e diferenças marcantes na composição lipídica da cutícula, nossos resultados indicam que, no caso de *A. gemmatalis* e *S. cosmioides* a susceptibilidade diferencial pode estar relacionada, ao menos em parte, com a composição química da cutícula.

Destaques

Nomuraea rileyi foi testado contra *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides*.

Conídios aderem e germinam em ambas as espécies.

Em *S. cosmioides* os tubos germinativos parecem não penetrar na cutícula.

Há grande variação na composição lipídica cuticular das duas espécies.

A susceptibilidade ao patógeno pode estar relacionada à composição lipídica cuticular.

Palavras-chave: adesão conidial; controle biológico; cutícula larval; hidrocarbonetos cuticulares; virulência.

1. Introdução

Os agentes patogênicos para controle biológico são uma poderosa e promissora ferramenta no combate às espécies-praga, sobretudo por sua seletividade e vantagens ambientais. Entre estes agentes, os fungos entomopatogênicos têm papel de destaque, constituindo-se nos principais agentes por serem capazes de penetrar na cutícula dispensando a necessidade de ingestão por parte do inseto. Além disso, podem provocar a morte dos hospedeiros nos diferentes estágios de desenvolvimento (Alves et al., 2008; Castrillo et al., 2005; Shah e Pell, 2003; Lacey et al., 2001).

A gama de hospedeiros varia conforme a espécie do entomofungo, podendo atingir insetos de diversas ordens, como *Metarhizium anisopliae*, por exemplo (Alves et al., 2008), ou ser restrita a espécies de poucas famílias dentro de uma única ordem, como é o caso de *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson), que infecta principalmente lepidópteros, e em sua maioria, representantes da superfamília Noctuoidea (Boucias et al., 1982; Ignoffo, 1981; Ignoffo et al., 1976), representada pela maioria das espécies de elevada importância econômica (Gallo et al., 2002).

Para que o processo de infecção se desenvolva, uma série de interações entre o entomofungo e o inseto hospedeiro precisa ser estabelecida e a epicutícula dos insetos, cujos principais componentes são os lipídios (Guo e Blomquist, 1991; Lockey, 1985, 1988) é a primeira barreira de proteção que precisa ser vencida. A proteção que os lipídios cuticulares conferem aos insetos contra

micro-organismos pode ser tanto de origem física, como uma barreira que evita a invasão fúngica, como química, por propriedades que aumentem a resistência da cutícula contra agentes invasores (Golebiowski et al., 2008; Koidsumi, 1957).

O processo de infecção de *N. rileyi* sobre lepidópteros já foi descrito em hospedeiros como *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Erebidae) e *Bombyx mori* Linnaeus, 1782 (Bombycidae) (Boucias e Pendland, 1982; Kumar et al., 1997). A virulência de *N. rileyi* encontra-se bem documentada com inúmeros registros de epizootias em campo (Allen et al., 1971; Ignoffo et al., 1975; 1976a) e em trabalhos conduzidos em laboratório (Ignoffo et al., 1976b; Puttler et al., 1976; Vega-Aquino et al., 2010). Embora patogênico contra diversas espécies, um aspecto intrigante relacionado a este patógeno é que sua ação supressiva em epizootias naturais ocorre em uma restrita gama de hospedeiros (Boucias et al., 2000; Sosa-Gómez e Silva, 2002). Além disso, estudos laboratoriais demonstram virulência diferencial entre isolados para diversas espécies de lepidópteros, sendo mais efetivo contra os hospedeiros dos quais foram isolados do que contra outras espécies e a diversidade genética tem sido mais relacionada com a espécie hospedeira do que com a localização geográfica (Boucias et al., 2000; Suwannakut et al., 2005).

Boucias et al. (1988) sugerem que forças hidrofóbicas entre os conídios e a cutícula do hospedeiro mediarão a adesão dos conídios sobre a superfície do inseto e que este seria um dos aspectos importantes na susceptibilidade ao patógeno. Essa hidrofobicidade pode ser influenciada por lipídios cuticulares (Lord e Howard, 2004). Além disso, o envolvimento de lipídios cuticulares na ativação da germinação conidial também já foi demonstrada (Boucias and Pendland, 1984) e outros estudos relacionaram efeitos de lipídios cuticulares sobre diversos aspectos relacionados à infecção fúngica (El-Sayed et al., 1991; Golebiowski et al., 2011, 2013; Jarrold et al., 2007; Lecuona et al., 1997; Smith e Grula, 1982; Sosa-Gómez et al., 1997).

Neste trabalho comparou-se, em laboratório, a susceptibilidade de duas espécies de larvas de lepidópteros à *N. rileyi* que em campo são diferentemente infectadas, e simultaneamente, analisou-se a composição lipídica e estrutura tegumentar destas espécies e a interação cuticular com os conídios do fungo, buscando esclarecer possíveis mecanismos de susceptibilidade/resistência à infecção por este patógeno.

2. Materiais e métodos

2.1 Insetos

Foram utilizadas larvas da lagarta-da-soja *A. gemmatalis* e da lagarta-das-vagens *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Noctuidae) obtidas junto à criação massal do Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. A criação dos insetos foi

mantida em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase 14 horas). A alimentação das larvas constou de dieta artificial (Greene et al., 1976) para larvas de ambas espécies.

2.2. Fungos

Nos bioensaios empregaram-se as linhagens CH87551 e UB93150 de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isoladas de *A. gemmatalis*, coletadas em Cachoeirinha, RS e Uberaba, MG, e mantidas em meio SMAY na Coleção de Entomopatógenos do Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

2.3. Bioensaios

Inicialmente, realizou-se revigoração das linhagens de *N. rileyi* por meio de bioensaios com suspensões de 10^8 conídios/mL, utilizando-se larvas de *A. gemmatalis*, reisolando-se o fungo em meio SMAY.

Os bioensaios para determinação da virulência do fungo *N. rileyi* foram conduzidos em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas) utilizando-se alíquotas de 1,5mL das suspensões de conídios de primeiro repique (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL) aplicadas sobre discos de papel filtro com 8 cm de diâmetro dispostos em placas de Petri. As larvas foram colocadas em contato com o papel filtro por 24 horas e após este período os insetos foram transferidos para copos plásticos de 200 mL, com tampa, contendo dieta artificial, avaliando-se a mortalidade diariamente até o estágio de pupa. Os ensaios foram realizados com 600 larvas de segundo ínstar de cada espécie, utilizando-se 150 lagartas para o controle e 150 para cada concentração. A viabilidade dos conídios foi determinada pela metodologia de Daoust and Roberts (1982).

Devido a mortalidade das larvas de *S. cosmioides*, em bioensaios com *N. rileyi* ter sido inferior a 50%, calculou-se a porcentagem de sobrevivência de ambas as espécies até o fim do desenvolvimento e até o oitavo dia, que representa a tempo médio de sobrevivência da maioria das larvas. A sobrevivência média e o erro padrão foram obtidos em função do tempo de observação através do método de Kaplan-Meier. A comparação dos múltiplos grupos foi efetuada aplicando-se o teste não paramétrico Log-rank com nível de significância de 5% usando Statistical Package for Social Sciences (SPSS versão 13). As concentrações letais medianas CL_{50} e CL_{95} no oitavo dia foram estimadas com limites de confiança de 95% com análise Logit usando SPSS versão 13.

2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas utilizando larvas de segundo instar das duas espécies, submetidas a concentrações de $2 \cdot 10^8$ conídios/mL, em bioensaios com as

mesmas linhagens e metodologia anteriormente descritas. Amostras de 5 a 8 larvas de cada espécie foram sacrificadas 24, 48 e 72 horas após contato com os conídios e fixadas para processamento e análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF. Para a fixação, as lagartas foram decapitadas e imediatamente mergulhadas em fixador Carnoviski, onde permaneceram por 24 horas em temperatura ambiente e após foram transferidas para solução tampão cacodilato de sódio 0,2% e mantidas a 4° C até a análise por MEV. Para esta análise, o material foi lavado sucessivas vezes com diferentes concentrações de acetona e após submetido a secagem por ponto crítico de CO₂, metalizado com ouro-paládio e observadas a 20Kv e 77μA.

2.5 Extração e identificação dos lipídios cuticulares

Para extração dos lipídios cuticulares foram usadas 1,49 e 1,80 g de exúvias do último instar larval, de *A. gemmatalis* e *S. cosmioides*, respectivamente, obtidas após a pupação. A cápsula cefálica foi removida e o material lavado com água destilada por três vezes e após, secado sob temperatura de 25 °C. O material obtido foi acondicionado a -15 °C até o momento da análise.

A extração dos lipídios cuticulares foi realizada a partir de dois sistemas solventes diferentes: hexano (50 mL) e uma solução de diclorometano:metanol (2:1) (60 mL), na Catedra de Farmacognosia, Facultad de Química, da Universidad de la Republica, em Montevideo, UY.

Para extração por hexano, o material biológico foi acondicionado em balão com refluxo e submetido a ebulição (65±3 °C) por 1 h 45 min e depois deixado em maceração por cerca de 20 h. O extrato resultante foi filtrado e evaporado à pressão reduzida a 40 °C, sendo depois pesado e ressuspendido com 5mL de hexano. Quando necessário fez-se uso de sonicador para recuperação total dos extratos.

Posteriormente à extração com hexano, o mesmo material foi submetido à extração em 60 mL de solução diclorometano:metanol (2:1) em agitação por 1 h 10 min (±25 °C) e após deixado em maceração por aproximadamente 20 horas. Após, o extrato foi filtrado e evaporado à pressão reduzida a 40 °C e o extrato resultante foi pesado e ressuspendido com 5mL de acetato de etila. Sempre que necessário, fez-se uso de sonicador para recuperação total dos extratos brutos.

Os extratos brutos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel 60F254 MERCK, utilizando-se como fases móveis clorofórmio:metanol (98:2) e hexano:acetato de etila (20:1) e hexano:tolueno (4:1) para os extratos hexânicos, e clorofórmio:metanol (85:15 e 90:10) para os extratos diclorometano-metanólicos.

Após a análise inicial por CCD, os extratos brutos foram fracionados por cromatografia de coluna aberta usando uma coluna de sílica gel de 100mm · 6mm sílica. Para isto, utilizou-se 1mL

de extrato, que foi secado em fluxo de nitrogênio para quantificação da massa de extrato. O volume de sílica utilizado foi de 150 vezes a massa do extrato.

Para os extratos hexânicos, os solventes de eluição utilizados na coluna constaram de 10 ml de cada solução a seguir: hexano; hexano:acetato de etila (95:5); hexano:acetato de etila (90:10); hexano:acetato de etila (85:15) e por último clorofórmio:metanol (50:50). Todas as frações resultantes foram analisadas em CCD, sendo que para as correspondentes às três primeiras soluções de solventes de eluição da coluna utilizou-se fase móvel hexano:acetato de etila (95:05) e para as demais uma solução clorofórmio:metanol (98:02).

Para os extratos diclorometano-metanólicos, os solventes de eluição constaram de 10 mL de cada uma das seguintes soluções: clorofórmio:metanol 85:15; clorofórmio:metanol 50:50 e metanol 100%. Após a separação dos compostos por coluna de sílica, todas as frações resultantes foram analisadas por CCD com uso de fases móveis de clorofórmio/metanol (85:15 e 80:20) e aquelas correspondentes à eluição clorofórmio:metanol (50:50) também foram analisadas em CCD com esta mesma fase móvel. As placas de CCD foram observadas em lâmpada UV a 254 e 366 nm e revelador sulfato de cobre (CuSO₄) foi utilizado para a verificação da presença de compostos orgânicos.

As frações de cada extrato que apresentaram as mesmas bandas foram unidas e alíquotas correspondentes foram submetidas a análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa GC-MS (HPGC 6890 MJ5973, coluna HP-S 30m, ID0.25m e programa de temperatura de 150 a 280 °C, 3 °C/min.) com Bibliotecas de espectros de massas de impacto eletrônico (EI) a 70 ev. NIST05a.L e Wiley275.L. As bibliotecas foram utilizadas para a identificação dos diferentes compostos, cujos espectros e tempos de retenção também foram comparados com índice de Kovats e com os resultados de padrões como parafina e parafilme. A fragmentação dos hidrocarbonetos foi analisada de acordo com Hesse et al. (1999), e Nelson e Blomquist (1995), o que permitiu a identificação dos pontos de ramificação dos hidrocarbonetos detectados.

3. Resultados

3.1 Bioensaios

A mortalidade causada por *N. rileyi* foi significativamente diferente entre as larvas das duas espécies. As duas linhagens avaliadas causaram elevada mortalidade para *A. gemmatalis* e o efeito observado foi dose-dependente tanto em relação ao número de mortes como na antecipação do surgimento dos efeitos, sobretudo com a linhagem UB93150. Observou-se mortalidade no sexto e no sétimo dia com as concentrações 10⁸ e 10⁹ conídios/mL e apenas no sétimo dia com a concentração 10⁷ conídios/mL. Nos ensaios com a linhagem CH87551, o período de ocorrência de

mortalidade foi mais longo, iniciando no quinto (concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL) e sétimo dia (10^7 conídios/mL) estendendo-se até o décimo (10^7 e 10^9 conídios/mL) e 11º dia (10^8 conídios/mL), porém efeito dose-dependente não foi significativo entre as duas concentrações mais elevadas (Figuras 1 e 2). Não houve mortalidade no grupo controle.

Para *S. cosmioides*, a linhagem CH87551 se mostrou inócua enquanto UB93150 causou mortalidade nas três concentrações avaliadas, embora em percentuais ínfimos, que não chegaram a 12%, mesmo na concentração mais elevada, o que não permitiu cálculos de CL_{50} , possíveis apenas para *A. gemmatalis* (Figura 3). Além disso, o tempo transcorrido para as mortes foi maior, iniciando apenas a partir do oitavo e se estendendo até o 14º dia (Figuras 1 e 2).

Apesar de pouco significativa, a linhagem UB93150 foi capaz de infectar e matar larvas de *S. cosmioides*, diferentemente da linhagem CH87551, que por sua vez foi mais efetiva para *A. gemmatalis*.

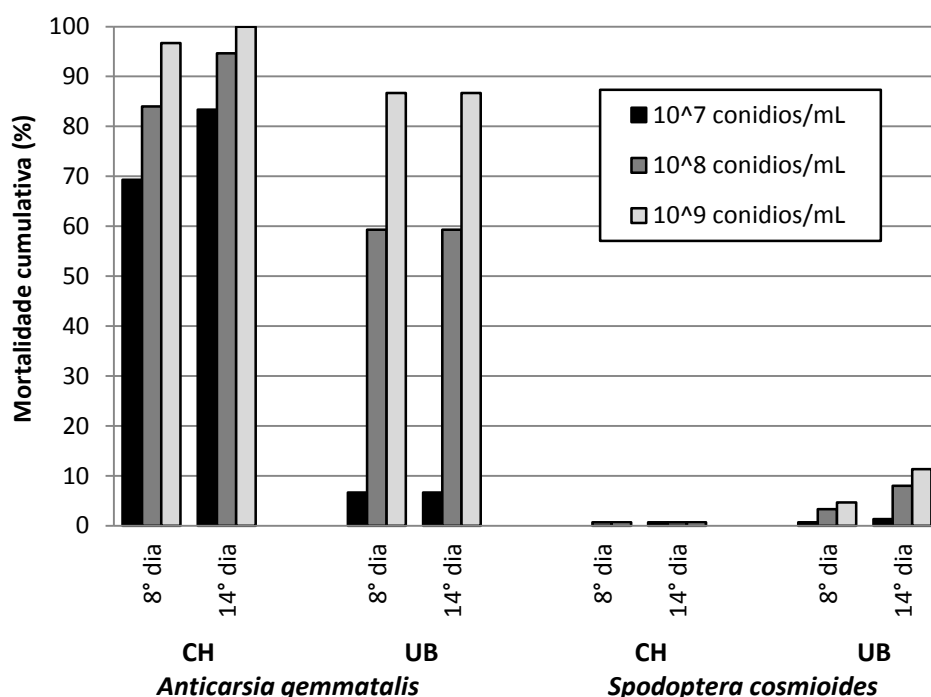


Figura 1. Mortalidade cumulativa (%) de larvas de segundo instar de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* (n= 150) tratadas com três concentrações de isolados de *Nomurea rileyi* (CH87551 e UB93150) no oitavo e décimo quarto dias após inoculação. Não houve mortalidade no grupo controle.

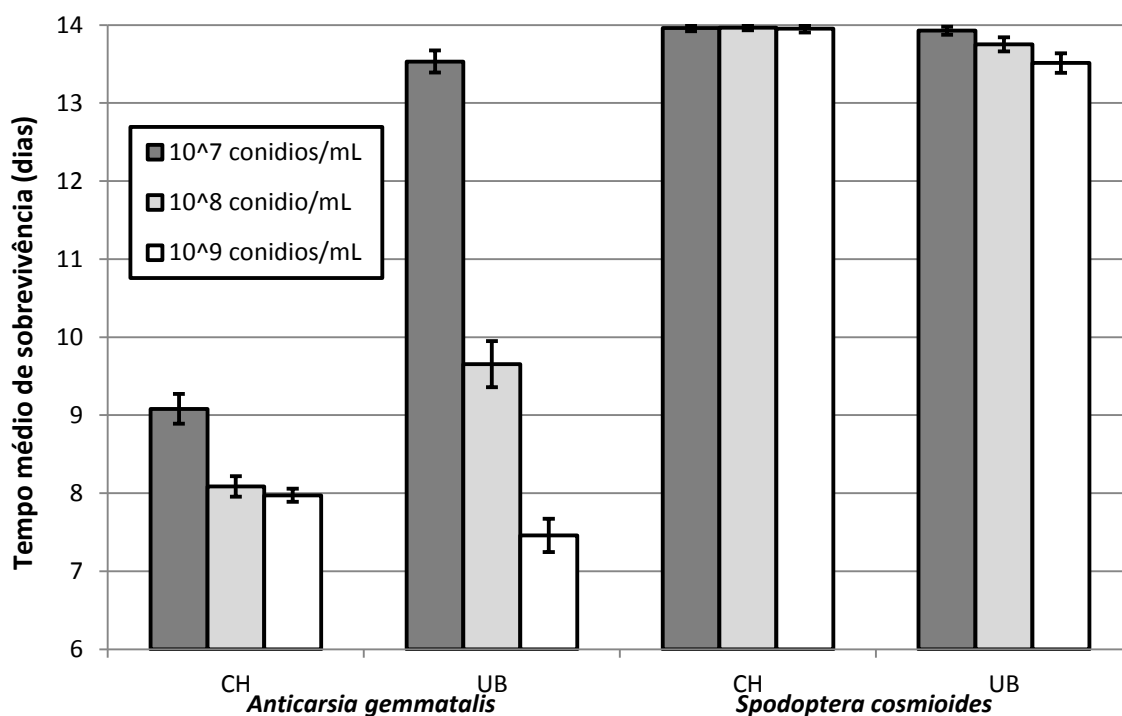


Figura 2. Tempo médio de sobrevivência (Kaplan-Meier) e intervalo de confiança (95%) de larvas de segundo instar de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* (n= 150) expostas ao fungo *Nomuraea rileyi* (CH87551 e UB93150).

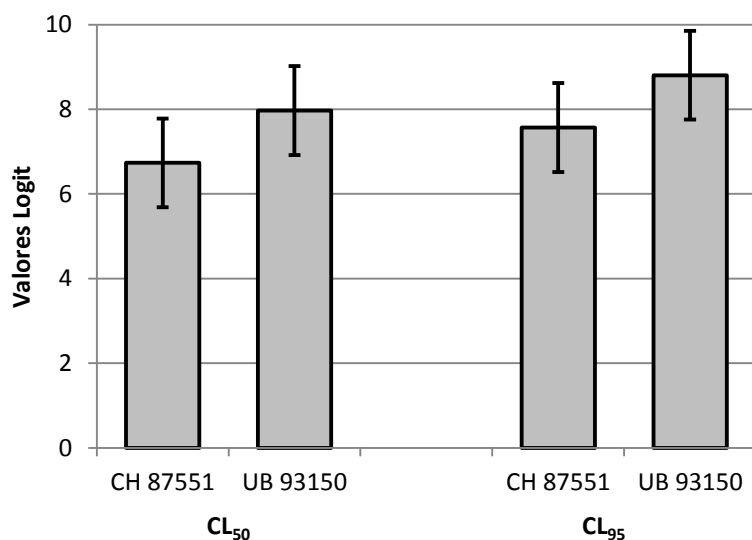


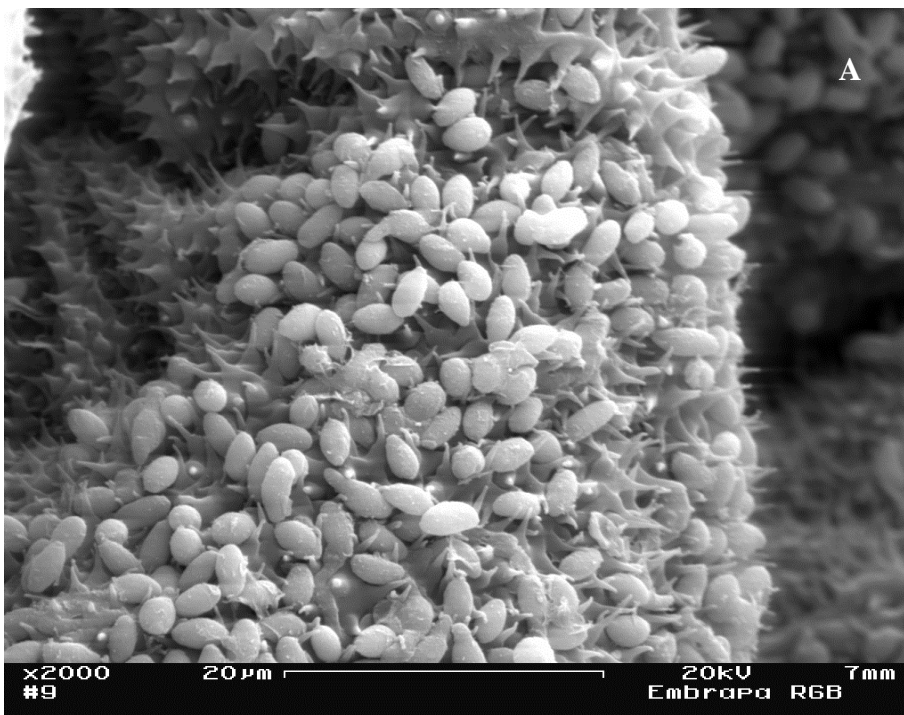
Figura 3. CL₅₀ e CL₉₅ e intervalo de confiança de larvas de segundo instar de *Anticarsia gemmatalis* (n= 150) expostas a isolados de *Nomuraea rileyi* (CH87551 e UB93150) oito dias após inoculação.

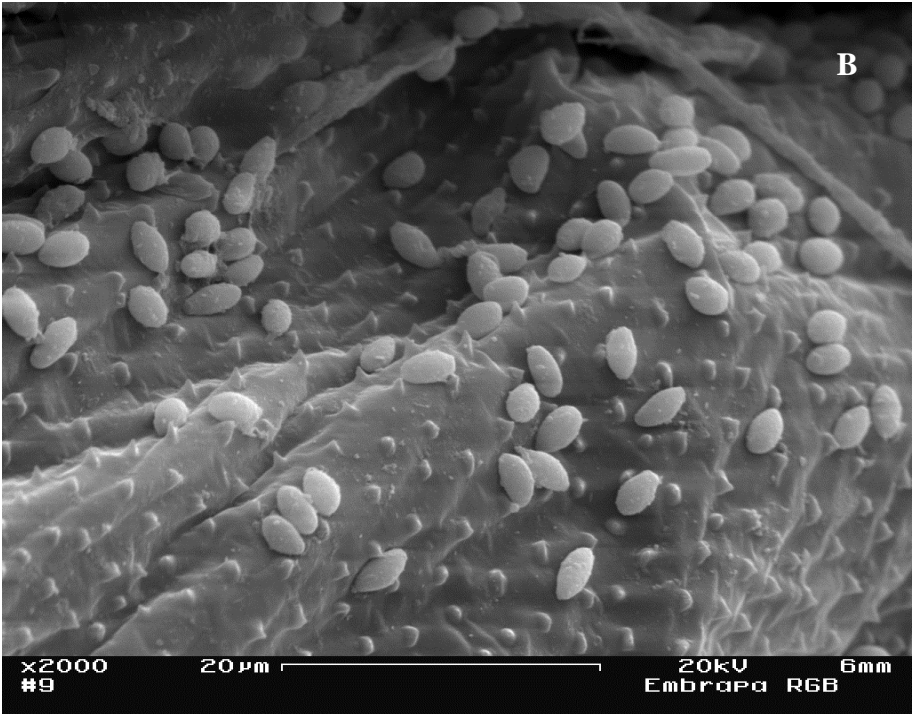
3.2 Microscopia eletrônica de varredura

Nas imagens de MEV verificaram-se conídios de *N. rileyi* aderidos à cutícula larval de ambas as espécies, principalmente nos insetos obtidos após permanecerem 24 horas em contato com a suspensão de esporos (Figuras 4A e B). A quantidade de conídios aderidos em 48 horas, ou seja,

após as larvas permanecerem 24 horas na dieta, aparentemente diminuí, embora muitos conídios foram observados em diferentes regiões da superfície cuticular das larvas, especialmente em *S. cosmoides*, tanto na região ornamentada da cutícula, como em regiões lisas, incluindo partes dos pseudópodes, na base das cerdas ou ainda nas regiões intersegmentares, mesmo 72 horas após o contato inicial (Figura 4C).

Nas imagens efetuadas empregando larvas em 24 horas, observou-se a formação de tubo germinativo em conídios sobre larvas das duas espécies. No entanto, em *A. gemmatilis* observou-se em apenas alguns conídios, principalmente em regiões com maior quantidade (Figura 4A). Além disso, a maioria parece germinar perpendicularmente em direção ao interior da larva. Em *S. cosmoides*, porém, o crescimento do tubo germinativo é maior e proporcionalmente visível em mais conídios e parece desenvolver-se paralelamente a superfície cuticular sem penetrar a cutícula (Figura 4D).





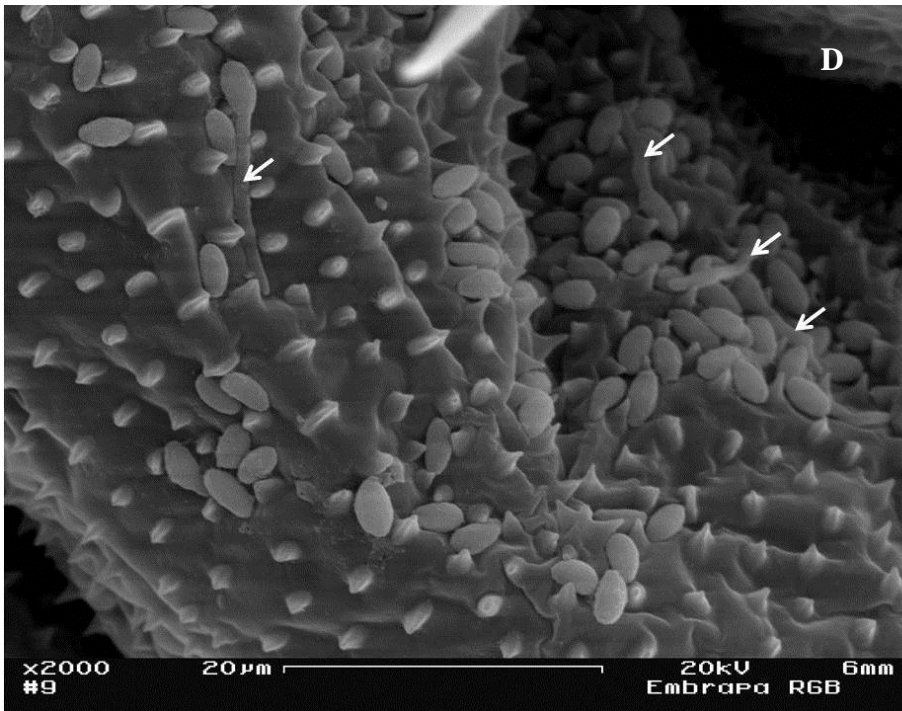


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura de larvas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* tratadas com suspensão de 10^8 conídios/mL de *Nomuraea rileyi*. **A:** Conídios de *N. rileyi* sobre larva de *A. gemmatalis* após 24 horas em contato com o inóculo; **B:** conídios de *N. rileyi* sobre larva de *S. cosmioides* após 24 horas em contato com o inóculo; **C:** conídios de *N. rileyi* sobre uma região lisa da cutícula larval de *S. cosmioides* após 72 horas; **D:** germinação de conídios de *N. rileyi* sobre larva de *S. cosmioides*. As setas indicam tubos germinativos desenvolvidos.

3.3 Rendimento de extratos e identificação dos compostos

A composição de lipídios cuticulares de ambos os lepidópteros diferem quali e quantitativamente (Tabela 1). Em *A. gemmatalis*, elevado conteúdo de hidrocarbonetos foi observado, principalmente de alcanos, fato já conhecido em insetos (Lockey, 1980), porém o mesmo não se observa em *S. cosmioides*, espécie na qual quantitativamente, apenas pouco mais de vinte por cento dos lipídios cuticulares identificados são hidrocarbonetos. Além disso, em *S. cosmioides* apenas dois compostos deste tipo foram identificados, esqualeno e um alcano ramificado com 34 carbonos, enquanto em *A. gemmatalis*, identificou-se uma série de alcanos, ramificados ou não, de 21 até 33 átomos de carbono (Tabela 2), sendo que os alcanos ramificados (desconsiderando a presença de esqualeno) respondem por mais da metade dos hidrocarbonetos identificados e constituem 40,1% do total de lipídios cuticulares.

Tabela 1: Rendimento total de extratos hexânico e diclorometano-metanólico de exúvias larvais de duas espécies de Lepidoptera (resultados expressos em % sobre a massa de material submetido à extração) e composição total dos extratos.

Espécie	Lipídios cuticulares totais	Hidrocarbonetos	Outros compostos
<i>Spodoptera cosmioides</i>	4,33%	20,52%	79,48%
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	3,25%	72,30%	27,70%

Embora consensualmente o esqualeno, presente em ambas as espécies, não seja sintetizado por artrópodes, sua presença já foi descrita em percevejos triatomídeos (Juárez e Blomquist, 1993) e a exemplo destes autores, a origem deste composto na exúvia larval das duas espécies de lepidópteros avaliadas pode ser explicada a partir dos ingredientes da dieta artificial fornecida.

Tabela 2: Quantidade (em %) dos compostos lipídicos dos extratos hexânico e diclorometano-metanólico de exúvias larvais de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* identificados por GC-MS.

Composto	<i>A. gemmatalis</i>	<i>S. cosmioides</i>	
Hidrocarbonetos	8-metil eicosano	0,16	nd
	Docosano	1,16	nd
	Pentacosano	1,75	nd
	Heptacosano	4,28	nd
	5-metil octacosano	3,07	nd
	Esqualeno	15,60	4,76
	Nonacosano	1,44	nd
	Heneitriacontano	4,05	nd
	2-metil triacontano	23,15	nd
	12,19-dimetil octacosano	0,25	nd
	13,19-dimetil triacontano	1,15	nd
	18-metil heneitriacontano	0,12	nd
	3-metil dotriacontano	7,09	nd
	15-metil dotriacontano	5,11	nd
	Tritriacontano	3,92	nd
13-metil tritriacontano	nd	15,77	
Aldeídos	Tetradecanal	0,07	nd
Alcoois	Hexadecanol	0,15	nd
Ácidos graxos	Ác. Mirístico	0,31	nd
	Ac. 14-metil Pentadecanoico	7,97	nd
	Ac. 15-metil Hexadecanóico	nd	0,45
	Ac. Palmítico	17,28	2,99
	Ac. Palmítico metil ester	0,43	nd
	Ac. Esteárico	0,31	0,67
Outros	Vitamina E	nd	70,86**
	Não identificados*	1,17	4,50

* Inclui um composto para *A. gemmatalis* e dois para *S. cosmioides*. nd: não detectado. **: soma de todos os acetatos.

Além do perfil de hidrocarbonetos, os demais compostos identificados também diferem entre as espécies. *S. cosmioides* apresenta ácidos graxos ramificados e saturados com 16 ou 18 átomos de carbono e uma quantidade considerável de Vitamina E, que corresponde a mais de dois terços do total de lipídios identificados. Em *A. gemmatalis* também ocorrem ácidos graxos saturados, ramificados ou não, mas também se verifica presença de ácido mirístico (C₁₄) (Figura 5).

Ainda identificou-se a presença de um aldeído e um álcool em *A. gemmatalis*, não presentes em *S. cosmioides* (Tabela 2).

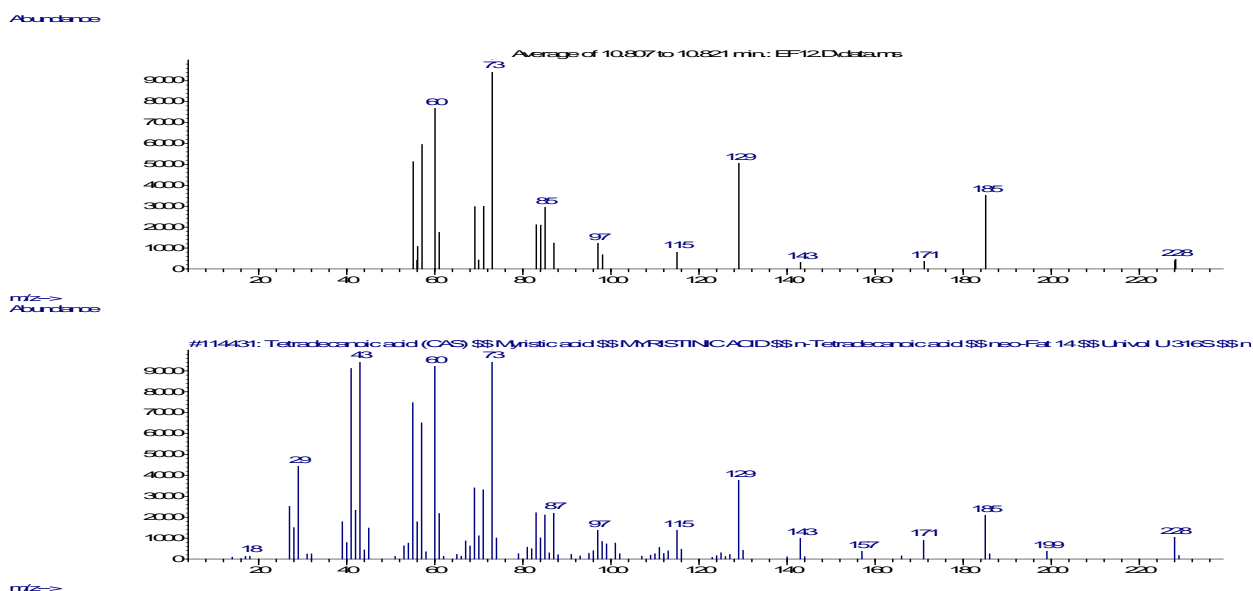


Figura 5: Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de exúvias larvais de *Anticarsia gemmatalis*. Os picos obtidos a partir fragmentação da amostra (parte superior) apresentam espectros de massa idênticos aos correspondentes ao ácido tetradecanóico, de acordo com Biblioteca NIST05a.L (parte inferior).

Discussão

Os resultados dos bioensaios apresentaram diferenças significativas na patogenicidade e também na virulência de *N. rileyi* sobre larvas de lepidópteros, fato este já demonstrado para este entomopatógeno (Boucias et al., 1982; Puttler et al., 1976). Embora seja conhecido que isolados de *N. rileyi* apresentam alta virulência quando empregados contra o hospedeiro original e atividade reduzida em outras espécies (Boucias et al., 2000; Moscardi et al., 1992), a ausência de linhagens originariamente isoladas de *S. cosmioides* (Sosa-Gómez e Silva, 2002) dificulta uma análise minuciosa nesse aspecto. A capacidade de um dos isolados causar mortalidade, mesmo que baixa, em *S. cosmioides*, aliada ao fato de que os conídios conseguem aderir efetivamente na cutícula larval e manter-se aderidos a ela, bem como a grande variabilidade de *N. rileyi* (Devi et al., 2007) nos permitem cogitar a possibilidade de que, com auxílio de outras técnicas como o uso de enzimas e de imunossupressores (Park e Kim, 2012; Supakdamrongkul et al., 2010) algumas linhagens podem ser estudadas e selecionadas para atuar contra espécies que atualmente não tem status de hospedeiras deste patógeno.

Embora já demonstrado que a adesão de conídios não é específica para um hospedeiro e que este processo deve ser mediado por forças hidrofóbicas (Boucias et al., 1988) e a capacidade de

adesão de conídios de *N. rileyi* à cutícula de espécies não suscetíveis ser conhecida (Boucias e Latgé, 1988), este aspecto ainda não havia sido observado em lepidópteros. Neste trabalho, a adesão foi confirmada em uma espécie-praga que apresentou baixa susceptibilidade em bioensaios e que, em campo, dados de ocorrência do patógeno são desconhecidos ou insignificantes. Esta adesão não deve ser apenas mecânica, uma vez que conídios foram observados na cutícula de *S. cosmioides* depois de 72 horas após o contato e mesmo as larvas tendo passado pelas sucessivas etapas de preparação para observação ao microscópio eletrônico de varredura.

A baixa susceptibilidade de *S. cosmioides* à *N. rileyi* não é devida a falta de adesão dos conídios à cutícula do inseto, assim outros mecanismos devem estar envolvidos. Estes podem incluir o envolvimento da composição cuticular da espécie, atuando em algum momento pré-penetração como observado anteriormente por Sitch e Jackson (1997), com o fungo *Verticillium lecanii*, o que justifica a presença de conídios não germinados sobre a cutícula de *S. cosmioides* 72 horas após o contato inicial com o patógeno.

A composição química da cutícula dos insetos pode ser responsável tanto pela resistência de algumas espécies como por sua susceptibilidade. Koidsumi (1957), demonstrou que *Chilo simplex* e *Bombyx mori* se tornavam mais suscetíveis quando a cutícula era esfoliada. Da mesma forma, larvas de *H. virescens* que se mostraram resistentes quando expostas a um biótipo de *N. rileyi* não o foram quando blastoporos do mesmo biótipo foram injetados na hemocele (Ignoffo e Garcia, 1985).

Alcanos são componentes comuns em lipídios cuticulares de insetos (Lockey, 1980) e vários foram identificados em *A. gemmatalis*, o que pode ser um dos fatores de patogenicidade de *N. rileyi* para esta espécie dada sua capacidade de utilização deste tipo de composto (St. Leger et al., 1988). Embora Boucias e Latgé (1988), demonstraram que a germinação de *N. rileyi* também pode ocorrer a partir de extratos cuticulares de espécies não hospedeiras, em *S. cosmioides* a ausência ou insuficiência de compostos deste tipo pode ser um dos fatores de resistência a este patógeno uma vez que a virulência está relacionada com a habilidade de um fungo entomopatogênico degradar hidrocarbonetos cuticulares do inseto hospedeiro (Pedrini et al., 2007, 2013). Hidrocarbonetos de cadeia curta como octano, descritos como inibidores de crescimento de *N. rileyi* (St. Leger et al., 1988) não foram identificados nas espécies avaliadas.

Embora alguns compostos lipídicos, incluindo aldeídos e ácidos graxos, tenham sido implicados na resistência de insetos a patógenos (Golebiowski et al., 2008; Sosa-Gómez et al., 1997), a espécie química envolvida, a quantidade presente ou a interação com outros compostos pode exercer um papel importante sobre sua real efetividade, visto que alguns destes compostos estão presentes em *A. gemmatalis*, que se mostra muito suscetível a *N. rileyi*. Neste aspecto, é interessante salientar que a formação de apressório no fungo fitopatogênico do abacate

Colletotrichum gloeosporioides é desencadeada pela presença de álcoois de cadeia longa (C₂₄ a C₃₀), na cera do hospedeiro (Podila et al., 1993). O gatilho de origem química da patogenicidade não deve ser o mesmo para os fungos fitopatogênicos e entomopatogênicos, no entanto vale a pena mencionar que hexacosanol (C₂₆) foi encontrado apenas entre os lipídios cuticulares de larvas *A. gemmatalis* e não encontrado em *S. cosmioides*.

Os únicos componentes identificados comuns entre as duas espécies, exceto o esqualeno, são dois ácidos graxos, o palmítico (C₁₆) e o esteárico (C₁₈), sendo o primeiro em quantidade superior em *A. gemmatalis*. Ácidos graxos de cadeias mais curtas, como ácido caprílico (C₈), presente na superfície larval de *H. zea* e apontados como um dos responsáveis por afetar a germinação conidial de *B. bassiana* (Smith e Grula, 1982), não foram identificados.

Interessante notar que, embora muitos conídios germinem sobre *S. cosmioides*, a penetração na cutícula aparentemente não ocorre, e o crescimento segue apenas superficialmente, diferentemente de *A. gemmatalis*, onde a penetração parece ser direta a partir dos conídios, como já demonstrado para este patógeno (Thorvilson et al., 1985). Se a penetração do tubo germinativo não ocorre por uma questão mecânica, ou se é inibida por algum componente cuticular ou ainda se não há absorção de nutrientes presentes na cutícula em quantidades suficientes por parte do fungo para sua manutenção e crescimento em *S. cosmioides*, isto ainda precisa ser melhor avaliado.

Além dos compostos encontrados, é possível que algum outro fator esteja atuando (ou ausente, no caso de *S. cosmioides*) a exemplo do que se verificou em *Bombyx mori* (Noda et al., 2010a, 2010b, 2011), espécie na qual D-eritro-C14-esfingosina foi identificado como fator de aceleração da germinação conidial de *N. rileyi* e co-fatores nitrogenados desencadeiam a germinação, sugerindo que as condições requeridas para germinação conidial não são apenas ambientais (Gardner, 1985), mas também nutricionais, que parecem ser mais complexas em *N. rileyi* que em outros fungos entomopatogênicos (Boucias et al., 2000; Boucias e Pendland, 1984). Sendo o peróxido de ergosterol um dos metabolitos ativos de *N. rileyi* (Prompiboon et al., 2008), uma via de defesa pode ser a presença de compostos de natureza anti-oxidante, com possível função protetora, como a vitamina E, presente em grande quantidade na cutícula larval de *S. cosmioides* (Fronza et al., 2013).

A capacidade enzimática do fungo, sobretudo a produção de lipases, pode estar vinculada com a resistência de *S. cosmioides*, uma vez que uma enzima deste tipo, quando aplicada na forma purificada, aumentou consideravelmente a mortalidade larval de *S. litura* (Supakdamrongkul, 2010). Além disso, a resposta imune contra *N. rileyi* é conhecida em outras espécies deste gênero e também pode ser um fator de resistência em *S. cosmioides* (Park e Kim, 2012).

São necessários novos estudos e comparações com outras espécies para compreender até que ponto a diferença significativa de patogenicidade e de virulência de *N. rileyi* entre *A. gemmatalis* e *S. cosmioides*, observada nos bioensaios, está relacionada com as diferenças na composição cuticular, ou se é apenas um dentre vários fatores responsáveis pela resistência ou susceptibilidade das espécies a este patógeno.

Conclusões

A patogenicidade e virulência do fungo sobre as duas espécies de larvas variou conforme as linhagens testadas e as espécies envolvidas.

A resistência de *S. cosmioides* ao fungo entomopatogênico *N. rileyi* não é uma questão de adesão dos conídios à superfície cuticular. Outros fatores, incluindo diferenças na composição lipídica da cutícula, devem estar envolvidos na resistência ao patógeno.

Hidrocarbonetos são os principais componentes entre os lipídios cuticulares de *A. gemmatalis*, enquanto vitamina E é o composto majoritário em *S. cosmioides*, seguido de 13-metil triacontano, com 15,77%.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado (Processo: 147526/2010-8), à CAPES (Edital CGCI 29/2009 – Convocatória Programa Capes/Udelar Projetos) e à Universidad de la Republica de Uruguay - UdelaR.

Referências bibliográficas

- Allen, G.E., Greene, G.L., Whitcomb, W.H., 1971. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Florida. Fla. Entomol. 54(2), 189-191.
- Alves, S.B., Lopes, R.B., Vieira, S.A., Tamai, M.A., 2008. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Alves, S.B., Lopes, R.B., (Eds.), Controle Microbiano de pragas na America Latina: avanços e desafios. FEALQ, Piracicaba, pp. 414
- Boucias, D.G., Latgé, J.P., 1988. Nonspecific induction of germination of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* with host and non-host cuticle extracts. J. Invertebr. Pathol. 51(2), 168-171. doi: 10.1016/0022-2011(88)90077-8
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1982. Ultrastructural studies on the fungus, *Nomuraea rileyi*, infecting the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. J. Invertebr. Pathol. 39(3), 338-345. doi: 10.1016/0022-2011(82)90058-1

- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1984. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 43(2), 288-292. doi: 10.1016/0022-2011(84)90153-8
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., Latgé, J.P., 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 54 (7) 1795-1805
- Boucias, D.G., Schoborg, E A., Allen, G.E., 1982. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatalis*. J. Invertebr. Pathol. 39(2), 238-240. doi: 10.1016/0022-2011(82)90017-9
- Boucias, D.G., Tigano, M.S., Sosa-Gómez, D.R., Glare, T.R., Inglis, P.W., 2000. Genotypic Properties of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi*. Biol. Control. 19, 124-138.
- Castrillo, L.A., Roberts, D.W., Vandenberg, J.D., 2005. The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. J. Invertebr. Pathol. 89(1), 46-56. doi: 10.1016/j.jip.2005.06.005
- Daoust, R.A., Roberts, D.W., 1982. Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 40, 107-117.
- Devi, U.K., Reineke, A., Rao, U.C.M., Reddy, N.R.N., Khan, A.P.A., 2007. AFLP and single-strand conformation polymorphism studies of recombination in the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Mycol. Res. 111, 716-725.
- 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 *Nomuraea rileyi*. Myopathol. 133, 95-102
- Fronza, E. Miguez, I., Specht, A., Barros, N.M., Heinzen, H., 2013. Identification of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate from the cuticle of soybean pods armyworm (*Spodoptera cosmioides*). Nat. Prod. Res. 27, 1-4 doi: 10.1080/14786419.2012.763125
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, L.P.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramini, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S. Omoto, C., 2002. Entomologia Agrícola (10 ed.). São Paulo: FEALQ. 920p
- Gardner, W.A., 1985. Effects of temperature on the susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 46(3), 348-349. doi: 10.1016/0022-2011(85)90082-5
- Golebiowski, M., Malinski, E., Bougus, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., 2008. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. Insect Biochem. Mol. Biol. 38, 619-627. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.03.005

- Gołębiowski, M., Boguś, M.I., Paszkiewicz, M., Stepnowski, P., 2011. Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 3177-3191. doi: 10.1007/s00216-010-4439-4
- Gołębiowski, M., Cerkowniak, M., Boguś, M.I., Włoka, E., Dawgul, M., Kamysz, W., Stepnowski, P., 2013. Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial activity. *J. Insect Physiol.* 59, 416–429 doi: 10.1016/j.jinsphys.2013.02.001
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69(4), 487-488.
- Guo, L., Blomquist, G.J., 1991. Identification, accumulation, and biosynthesis of the cuticular hydrocarbons of the southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 16(1), 19-30. doi: 10.1002/arch.940160104
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., 1999. Espectroscopia de masas. In: Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. *Metodos espectroscópicos em química orgânica*. 2nd edicion, Editorial sintesis, Valle Hermoso, Madrid. 219-311.
- Ignoffo, C.M., 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: Burges, H.D. (Ed.). *Microbial control of pests and plant diseases: 1970-1980*. Academic Press, London, p. 513-538.
- Ignoffo, C.M., Garcia, C., 1985. Host spectrum and relative virulence of an Equadoran and a Mississippian biotype of *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 45, 346-352.
- Ignoffo, C.M., Marston, N.L., Hostetter, D.L., Puttler, B., Bell, J.V., 1976a. Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. *J. Invertebr. Pathol.* 27(2), 191-198. doi: 10.1016/0022-2011(76)90145-2
- Ignoffo, C.M., Puttler, B., Hostetter, D.L., Dickerson, W.A., 1976b. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 28(2), 259-262. doi: 10.1016/0022-2011(76)90132-4
- Ignoffo, C.M., Puttler, B., Marston, N L., Hostetter, D.L., Dickerson, W.A., 1975. Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria rileyi* associated with noctuid pests of soybeans. *J. Invertebr. Pathol.* 25(1), 135-137. doi: 10.1016/0022-2011(75)90294-3
- Jarrold, S.L., Moore, D., Potter, U., Charnley, A.K., 2007. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol. Res.* 111, 240-249

- Juárez, P., Blomquist, G.J., 1993. Cuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* and *T. mazzotti*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B(3), 667-674.
- Koidsumi, K., 1957. Antifungal action of cuticular lipids in insects. *J. Insect Physiol.* 1(1), 40-51. doi: 10.1016/0022-1910(57)90022-7
- Kumar, V., Singh, G.P., Kumar, V., Babu, A.M., Datta, R.K., 1997. SEM study on the invasion of *Nomuraea rileyi* (Farlow) on silkworm, *Bombyx mori* Linn. causing green muscardine. *Mycopathol.* 138, 141-144.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biol. Control*, 21(3), 230-248. doi: 10.1006/bcon.2001.0938
- Lecuona, R., Clement, J.L., Riba, G., Joulie, C., Juárez, P., 1997. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. *J. Econ. Entomol.* 90(1), 119-123.
- Lockey, K.H., 1980. Insect cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol.* 64B, 457-462.
- Lockey, K.H., 1985. Insect cuticular lipids. *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.* 81(2), 263-273. doi: 10.1016/0305-0491(85)90311-6
- Lockey, K.H., 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.* 89(4), 595-645. doi: 10.1016/0305-0491(88)90305-7
- Lord, J.C., Howard, R.W., 2004. A Proposed Role for the Cuticular Fatty Amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in Preventing Adhesion of Entomopathogenic Fungi with Dry-conidia. *Mycopathol.* 158: 211-217.
- Moscardi, F., Kastelic, J.G., Sosa-Gómez, D.R., 1992. Susceptibilidade de três espécies de lepidópteros associados à soja à três isolados do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *An. Soc. Entomol. Braz.* 21(2), 93-100.
- Nelson, D.R., Blomquist, G.J., 1995. Insect waxes. In R. J. Hamilton (Ed.), *Waxes: chemistry, molecular biology and functions* (Vol. 6, pp. 349). Dundee, Scotland: The Oily Press Lipid Library.
- Noda, T., Meguri, T., Iimure, K., Ono, M., Araki, T., 2011. Potencial of D-erythro-C14-Sphingosina as an adjuvant for a fungal pesticide of *Nomuraea rileyi*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75(2), 373-375. doi: 10.1271/bbb.100722
- Noda, T., Ono, M., Iimure, K., Araki, T., 2010a. Characterization of a germination-accelerating factor from the silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(6), 1226-1230. doi: 10.1271/bbb.100031
- Noda, T., Ono, M., Iimure, K., Araki, T., 2010b. Isolation of a bioactive substance from the silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) that accelerates the germination of the entomopathogenic

- fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(3), 563-568.
doi: 10.1271/bbb.90757
- Park, J.-A., Kim, Y., 2012. Phospholipase A2 inhibitors in bacterial culture broth enhance pathogenicity of a fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Microbiol.* 50, 644-651.
- Pedrini, N., Crespo, R., Juárez, M.P., 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 146(1-2), 124-137. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.08.003
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Zhang, S., Keyhani, N.O., 2013. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2013.00024.
- Podila, G.K., Rogers, L.M., Kolattukudu, P.E., 1993. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol.* 103(1): 267-272. doi 10.1104/pp.103.1.
- Prompiboon, P., Bhumiratana, A., Ruchirawat, S., Boucias, D.G., Wiwat, C., 2008. Isolation of ergosterol peroxide from *Nomuraea rileyi* infected larvae of tobacco cutworm. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24(12), 2909-2917. doi: 10.1007/s11274-008-9830-3
- Puttler, B., Ignoffo, C.M., Hostetter, D.L., 1976. Relative susceptibility of nine caterpillar species to the fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 27(2), 269-270. doi: 10.1016/0022-2011(76)90157-9
- Shah, P.A., Pell, J.K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 413-423. doi: 10.1007/s00253-003-1240-8
- Sitch, J.C., Jackson, C.W., 1997. Pré-penetration events affecting host specificity of *Verticillium lecanii*. *Mycol. Res.* 101(5), 535-541.
- Smith, R.J., Grula, E.A., 1982. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 39(1), 15-22. doi: 10.1016/0022-2011(82)90153-7
- Sosa-Gómez, D.R., Boucias, D.G., Nation, J.L., 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J. Invertebr. Pathol.* 69(1), 31-39. doi: 10.1006/jipa.1996.4619
- Sosa-Gómez, D.R., Silva, J.J., 2002. *Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados*. Londrina: Embrapa Soja.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1988. Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 52(2), 356-359. doi: 10.1016/0022-2011(88)90147-4

- Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A., Wiwat, C., 2010. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. J. Invertebr. Pathol. 105, 228-235.
- Suwannakut, S., Boucias, D.G., Wiwat, C., 2005. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. J. Invertebr. Pathol. 90, 169-176.
- Thorvilson, H. G., Lewis, L.C., Pedigo, L.P., 1985. Histopathology of *Nomuraea rileyi* in *Plathypena scabra* larvae. J. Invertebr. Pathol. 45, 34-40.
- Vega-Aquino, P., Sanchez-Peña, S., Blanco, C.A., 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. J. Invertebr. Pathol. 103(3), 145-149. doi: 10.1016/j.jip.2009.12.002

Capítulo 4

Edegar Fronza¹, Alexandre Specht², Janaíne Katia Cavazzola¹, Rafael José Tomasi¹, Horácio Heinzen³, Neiva Monteiro de Barros¹

Superfície e composição lipídica cuticular de larvas de *Mythimna sequax* e *Rachiplusia nu* e susceptibilidade à *Nomuraea rileyi*

¹Laboratório de Controle de Pragas, Instituto de Biotecnologia – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, Caixa Postal 1352, CEP 95070-560 Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. fronzabio@yahoo.com.br.

²Embrapa-Cerrados BR 020 Km 18,- Caixa Postal: 08223 CEP 73310-970, Planaltina, DF – Brazil.

³Facultad de Química, Catedra de Farmacognosia, Universidad de la Republica, Av. General Flores, 118000. Montevideo, Montevideo, Uruguay.

Resumo

Com o objetivo de avaliar a relação entre a composição e estrutura cuticular de larvas de Noctuidae com a patogenicidade de *Nomuraea rileyi*, um entomofungo que ataca principalmente noctuídeos, duas linhagens (UB93150 e CH87551) deste biocontrolador foram testadas em bioensaios contra *Mythimna sequax* e *Rachiplusia nu* em concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL. Os bioensaios foram realizados sob condições controladas no Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul e as larvas foram alimentadas com dietas artificiais. Paralelamente, a composição lipídica cuticular larval destas espécies foi analisada e larvas submetidas a uma concentração de 10^8 conídios/mL foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) em 24, 48 e 72 horas após contato inicial. *M. sequax* não foi afetada por nenhuma linhagem avaliada. Para *R. nu* a CL_{50} (log dose) foi estimada em 9,16 e 8,26 para UB e CH, respectivamente. Hidrocarbonetos constituem a maior parte dos lipídios cuticulares em ambas as espécies, porém *M. sequax* apresentou apenas seis destes compostos enquanto *R. nu* apresentou 36. Imagens de MEV mostraram a presença de conídios aderidos à cutícula de *M. sequax* até 72 horas após contato inicial. Conídios germinados, com tubos germinativos crescendo paralelamente à superfície cuticular foram observados nesta espécie. Em *R. nu* conídios foram observados principalmente nas extremidades dos pseudópodes. Diferenças na estrutura e composição cuticular e também a variabilidade de *N. rileyi* podem estar relacionadas com as diferenças de patogenicidade observadas nas duas espécies e entre as duas linhagens testadas.

Palavras-chave: biocontrole, entomopatígeno, Noctuidae, lepidópteros-praga

1. Introdução

Nomuraea rileyi (Farlow) Samson é um entomofungo cujos hospedeiros preferencias pertencem a Noctuoidea [1,2], um táxon que congrega muitas pragas-chave de diversas culturas de elevada importância econômica [3].

Embora a ocorrência de epizootias causadas por este agente de biocontrole seja conhecida desde os anos setenta [4,5], a restrita gama de hospedeiros [6,7] continua sendo um aspecto intrigante no conhecimento deste organismo. Esta “seletividade” pode ser atribuída às diferenças e propriedades genotípicas do próprio fungo [1,8] ou a mecanismos inerentes aos hospedeiros, como sua estrutura e composição da cutícula, que é a primeira barreira de proteção contra agentes patogênicos [9]. Nesse aspecto, lipídios cuticulares, componentes de destaque na composição cuticular dos insetos [10,11], são citados como protetores contra penetração de agentes patogênicos [12], impedindo a adesão conidial na cutícula [13] como inibidores do crescimento fúngico [14] ou ainda como fungicidas [15].

Em Lepidoptera, estudos sobre lipídios cuticulares são descritos por [11] e a influencia destes sobre a patogenicidade de microrganismos foi analisada em bioensaios com *Heliothis zea* utilizando-se o fungo *Beauveria bassiana* [16] e ação antifúngica de hidrocarbonetos de cadeia curta foi descrita para *N. rileyi* e também *Metarhizium anisopliae* [17].

O objetivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade de duas espécies de lepidópteros-praga à *N. rileyi* e ao mesmo tempo comparar com a estrutura e composição lipídica cuticular de cada uma delas, buscando encontrar subsídios que possam ajudar a esclarecer as diferenças de susceptibilidade entre as espécies.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Insetos e fungo

Foram utilizadas larvas de duas espécies de Noctuidae, *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Noctuinae) e a falsa-medideira *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) (Plusiinae) obtidas junto à criação massal do Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. A criação dos insetos foi mantida em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ relative humidity and photofase 14 hours). A alimentação das larvas constou de dietas artificiais [18] para *M. sequax* e [19] para *R. nu*.

Os bioensaios empregaram as linhagens CH87551 e UB93150 de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isoladas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Erebidae), coletadas em Cachoeirinha, RS e Uberaba, MG, e mantidas em meio SMAY na Coleção de Entomopatógenos do Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

2.2 Bioensaios

Inicialmente, realizou-se revigoramento das linhagens de *N. rileyi* por meio de bioensaios com suspensões de 10^8 conídios/mL, utilizando-se larvas de *A. gemmatalis*, reisolando-se o fungo em meio SMAY.

Os bioensaios para determinação da virulência do fungo *N. rileyi* foram conduzidos em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo de 14 horas) utilizando-se alíquotas de 1,5 mL das suspensões de conídios de primeiro repique (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL) aplicadas sobre discos de papel filtro com 8 cm de diâmetro dispostos em placas de Petri. As larvas foram colocadas em contato com o papel filtro por 24 horas e após este período os insetos foram transferidos para copos plásticos de 200 mL, com tampa, contendo dieta artificial, avaliando-se a mortalidade diariamente até o estágio de pupa. Os ensaios foram realizados com 600 larvas de segundo ínstar de cada espécie,

utilizando-se 150 lagartas para o controle e 150 para cada concentração. A viabilidade dos conídios foi determinada pela metodologia de [20].

Devido a mortalidade das larvas de *M. sequax* em bioensaios com *N. rileyi* ter sido inferior a 50%, calculou-se a porcentagem de sobrevivência de ambas as espécies até o fim do desenvolvimento e até o oitavo dia, que representa a tempo médio de sobrevivência da maioria das larvas. A sobrevivência média e o erro padrão foram obtidos em função do tempo de observação através do método de Kaplan-Meier. A comparação dos múltiplos grupos foi efetuada aplicando-se o teste não paramétrico Log-rank com nível de significância de 5% usando Statistical Package for Social Sciences (SPSS versão 13). As concentrações letais medianas CL_{50} e CL_{95} no oitavo dia foram estimadas com limites de confiança de 95% com análise Logit usando SPSS versão 13.

2.3 Extração e identificação dos lipídios cuticulares

Para extração dos lipídios cuticulares foram usadas entre 1,70 e 1,44 g de exúvias do último instar larval, de *M. sequax* e *R. nu*, respectivamente, obtidas após a pupação. Para estas análises, *M. sequax* foi criada em azevém (*Lolium multiflorum*) e *R. nu* com dieta artificial. A cápsula cefálica foi removida e o material lavado com água destilada por três vezes e após, secado sob temperatura de 25 °C. O material obtido foi acondicionado a -15 °C até o momento da análise.

A extração dos lipídios cuticulares foi realizada a partir de dois sistemas solventes diferentes: hexano (50 mL) e uma solução de diclorometano:metanol (2:1) (60 mL), na Catedra de Farmacognosia, Facultad de Química, da Universidad de la Republica, em Montevideo, UY.

Para extração por hexano, o material biológico foi acondicionado em balão com refluxo e submetido à ebulição (65 ± 3 °C) por 1h 45 min e depois deixado em maceração por cerca de 20 h. O extrato resultante foi filtrado e evaporado à pressão reduzida a 40 °C, sendo depois pesado e ressuspenso com 5mL de hexano. Quando necessário fez-se uso de sonificador para recuperação total dos extratos.

Posteriormente à extração com hexano, o mesmo material foi submetido à extração em 60 mL de solução diclorometano:metanol (2:1) em agitação por 1h 10 min (± 25 °C) e após deixado em maceração por aproximadamente 20 horas. Após, o extrato foi filtrado e evaporado à pressão reduzida a 40 °C e o extrato resultante foi pesado e ressuspenso com 5mL de acetato de etila. Sempre que necessário, fez-se uso de sonificador para recuperação total dos extratos brutos.

Os extratos brutos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel 60F254 MERCK, utilizando-se como fases móveis clorofórmio:metanol (98:2) e hexano:acetato de etila (20:1) e hexano:tolueno (4:1) para os extratos hexânicos, e clorofórmio:metanol (85:15 e 90:10) para os extratos diclorometano-metanólicos.

Após a análise inicial por CCD, os extratos brutos foram fracionados por cromatografia de coluna aberta usando uma coluna de sílica gel de 100mm · 6mm. Para isto, utilizou-se 1mL de extrato, que foi secado em fluxo de nitrogênio para quantificação da massa de extrato. O volume de sílica utilizado foi de 150 vezes a massa do extrato.

Para os extratos hexânicos, os solventes de eluição utilizados na coluna constaram de 10 ml de cada solução a seguir: hexano; hexano:acetato de etila (95:5); hexano:acetato de etila (90:10); hexano:acetato de etila (85:15) e por último clorofórmio:metanol (50:50). Todas as frações resultantes foram analisadas em CCD, sendo que para as correspondentes às três primeiras soluções de solventes de eluição da coluna utilizou-se fase móvel hexano:acetato de etila (95:05) e para as demais uma solução clorofórmio:metanol (98:02).

Para os extratos diclorometano-metanólicos, os solventes de eluição constaram de 10 mL de cada uma das seguintes soluções: clorofórmio:metanol 85:15; clorofórmio:metanol 50:50 e metanol 100%. Após a separação dos compostos por coluna de sílica, todas as frações resultantes foram analisadas por CCD com uso de fases móveis de clorofórmio/metanol (85:15 e 80:20) e aquelas correspondentes à eluição clorofórmio:metanol (50:50) também foram analisadas em CCD com esta mesma fase móvel. As placas de CCD foram observadas em lâmpada UV a 254 e 366 nm e revelador sulfato de cobre (CuSO₄) foi utilizado para a verificação da presença de compostos orgânicos.

As frações de cada extrato que apresentaram as mesmas bandas foram unidas e alíquotas correspondentes foram submetidas a análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa GC-MS (HPGC 6890 MJ5973, coluna HP-S 30m, ID0.25m e programa de temperatura de 150 a 280 °C, 3 °C/min.) com Bibliotecas de espectros de massas de impacto eletrônico (EI) a 70 ev. NIST05a.L e Wiley275.L. As bibliotecas foram utilizadas para a identificação dos diferentes compostos, cujos espectros e tempos de retenção também foram comparados com índice de Kovats e com os resultados de padrões como parafina e parafilme. A fragmentação dos hidrocarbonetos foi analisada de acordo com Hesse et al. (1999), e Nelson and Blomquist (1995), o que permitiu a identificação dos pontos de ramificação dos hidrocarbonetos detectados.

2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas utilizando larvas de segundo instar das duas espécies, submetidas a concentrações de $2 \cdot 10^8$ conídios/mL, em bioensaios com as mesmas linhagens e metodologia anteriormente descritas. Amostras de 5 a 8 larvas de cada espécie foram sacrificadas 24, 48 e 72 horas após contato com os conídios e fixadas para processamento e análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF. Para a fixação, as lagartas foram decapitadas e imediatamente mergulhadas em fixador Carnoviski, onde permaneceram por 24 horas em temperatura ambiente e após foram transferidas para solução tampão cacodilato de sódio 0,2% e mantidas a 4° C até a análise por MEV. Para esta análise, o material foi lavado sucessivas vezes com diferentes concentrações de acetona e após submetido a secagem por ponto crítico de CO₂, metalizado com ouro-paládio e observadas a 20Kv e 77µA.

3. Resultados

3.1 Bioensaios

As linhagens avaliadas se mostraram inócuas contra *M. sequax*, que não apresentou mortalidade alguma, mesmo nas concentrações mais elevadas. Para *R. nu*, foi possível estabelecer a CL₅₀ com a utilização de ambas linhagens, sendo CH87551 mais efetiva (Tabela 1). No bioensaio com a linhagem CH, as primeiras mortes foram observadas no quinto dia, estendendo-se até o décimo dia, com alguma morte eventual nos dias posteriores. Para a linhagem UB, as primeiras mortes foram observadas apenas no sexto dia, também se estendendo basicamente até o décimo dia, com apenas duas mortes nos dias seguintes. A concentração 10^7 da linhagem UB foi praticamente inócua (Figura 1). Máxima mortalidade foi observada no oitavo dia para a linhagem CH e no sétimo dia para UB, no entanto, para esta linhagem, mortalidade semelhante foi observada no oitavo e nono dias (Figura 2).

O tempo médio de sobrevivência (Figura 3) variou conforme a linhagem e as concentrações avaliadas, sendo sempre inferior para a linhagem CH87551, com variação de cerca de dois dias nas concentrações 10^7 e 10^8 e cerca de um dia na concentração 10^9 .

Tabela 1: CL₅₀ e CL₉₅ de duas linhagens de *Nomuraea rileyi* sobre larvas de segundo ínstar de *Rachiplusia nu*. Dados de mortalidade no oitavo dia.

Linhagem*	<i>Rachiplusia nu</i>	
	Log (conc.)	limite confiança 95% (log conc.)
UB – CL ₅₀	9,16	8,12 – 10,21
UB – CL ₉₅	10,20	9,15 – 11,25
CH – CL ₅₀	8,26	7,21 – 9,31
CH – CL ₉₅	9,30	8,25 – 10,35

*UB93150 e CH87551

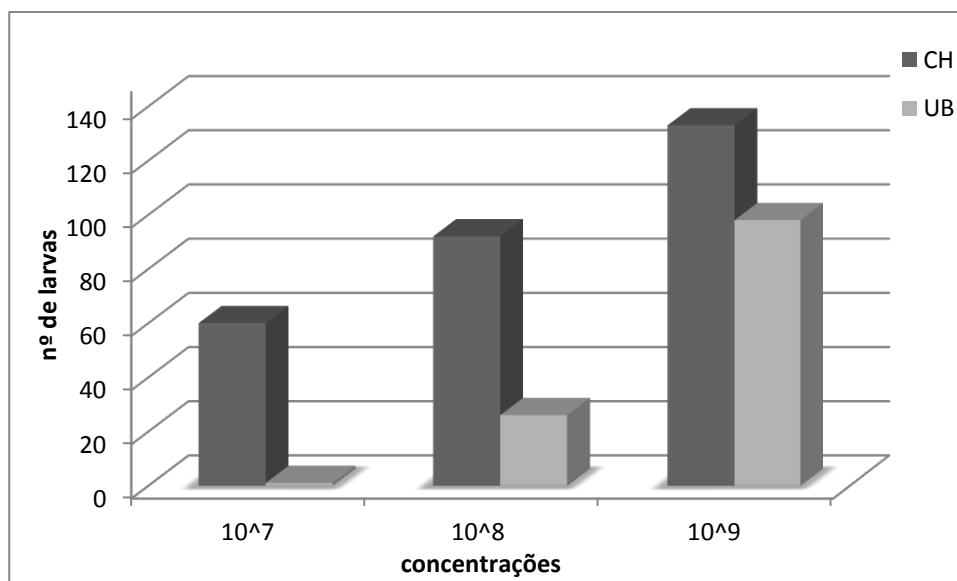


Fig. 1 Mortalidade de larvas de segundo instar de *Rachiplusia nu*, submetidas a bioensaio com duas linhagens (CH87551 e UB93150) e três concentrações de *Nomuraea rileyi*.

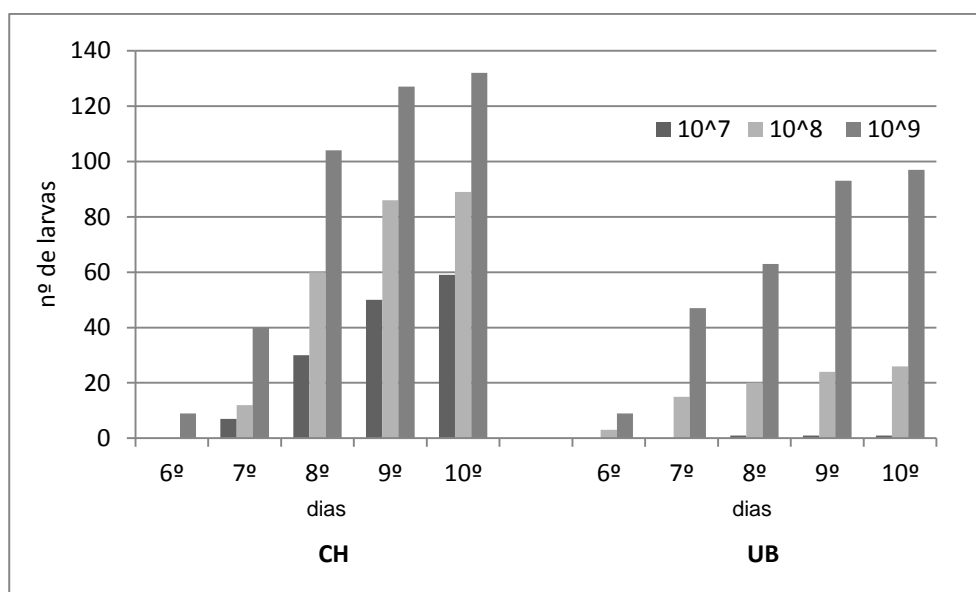


Fig. 2 Mortalidade diária cumulativa de larvas de segundo instar de *Rachiplusia nu*, submetidas a bioensaio com duas linhagens de *Nomuraea rileyi* (CH87551 e UB93150).

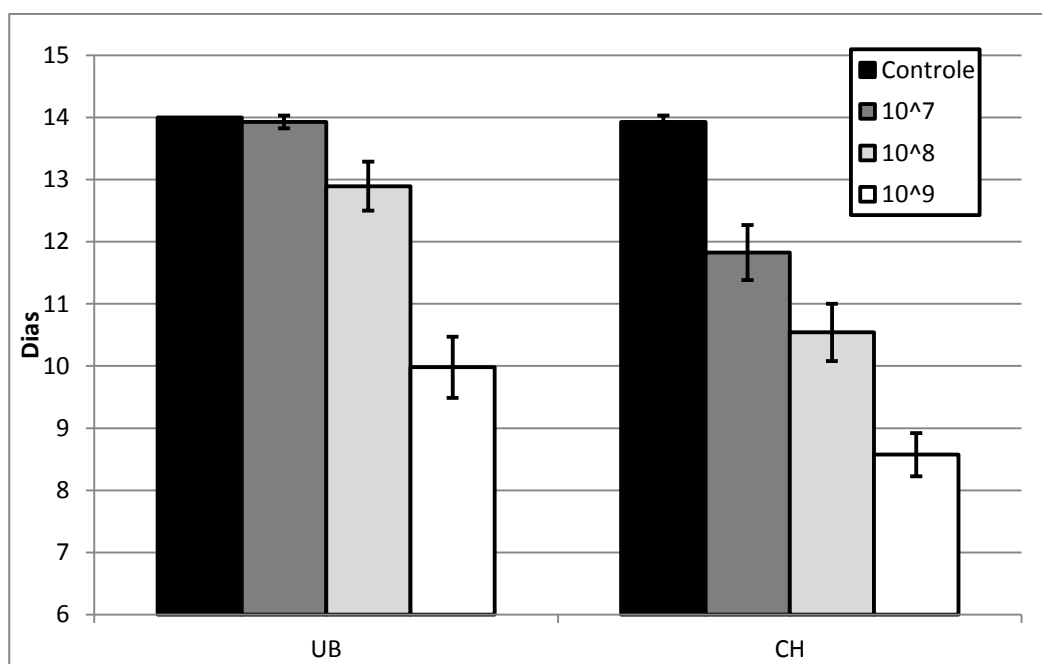


Fig. 3 Tempo médio de sobrevivência (Kaplan-Meier) e intervalo de confiança (95%) de larvas de segundo instar de *Rachiplusia nu* (n=150) expostas a três concentrações do fungo *Nomuraea rileyi* (linhagens CH87551 e UB93150).

3.2 Rendimento de extratos e identificação dos compostos

M. sequax e *R. nu* apresentaram diferenças quali-quantitativas na composição dos extratos (Tabela 3). As duas espécies apresentaram hidrocarbonetos, sobretudo alcanos, ramificados ou não, como sendo os compostos predominantes quantitativamente, no entanto em *M. sequax* apenas seis compostos deste tipo foram identificados, com cadeias C₂₄ a C₃₄ enquanto em *R. nu* chegou a 36, com cadeias desde C₁₆ a C₃₄. Além dos hidrocarbonetos, ácidos graxos (C₁₆ a C₂₀) ramificados ou não, constituem mais de 20% dos lipídios de *M. sequax*, destacando-se o ácido palmítico. Em *R. nu*, estes compostos constituem menos de 2,5% dos lipídios e estão representados por cadeias C₁₆ e C₁₈ apenas. Outros compostos identificados foram um fitol e um carotenoide em *M. sequax* e vitamina E e pimpinolina em *R. nu*.

Tabela 2: Composição dos extratos hexânico e diclorometano-metanólico de exúvias larvais de duas espécies de Lepidoptera submetidas a extração por hexano e após por diclorometano-metanol (2:1)

Espécie	Lipídios cuticulares totais (%)	Hidrocarbonetos (%)	Outros compostos (%)
<i>Mythimna sequax</i>	2,36	73,89	26,11
<i>Rachiplusia nu</i>	9,94	83,62	16,38

3.3 Microscopia eletrônica de varredura

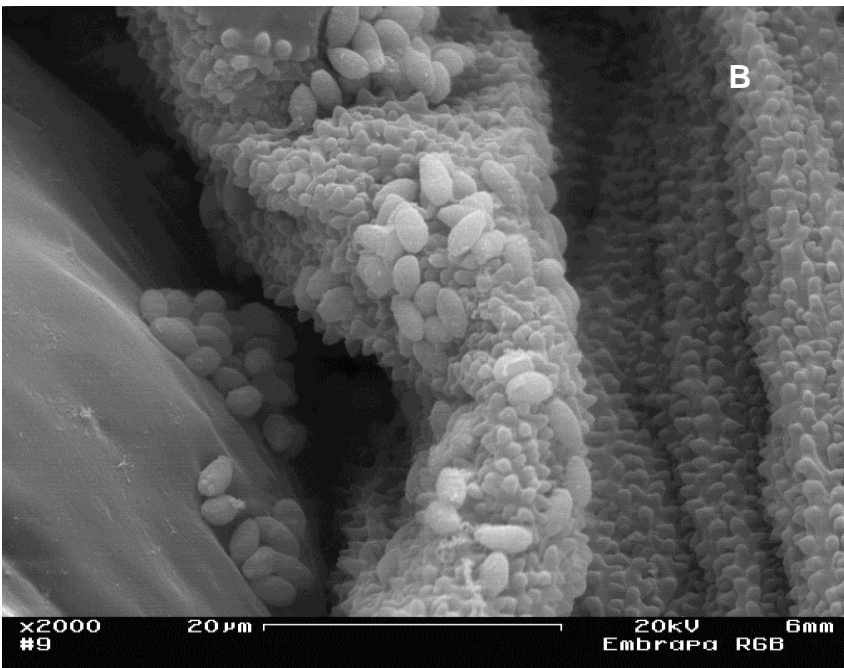
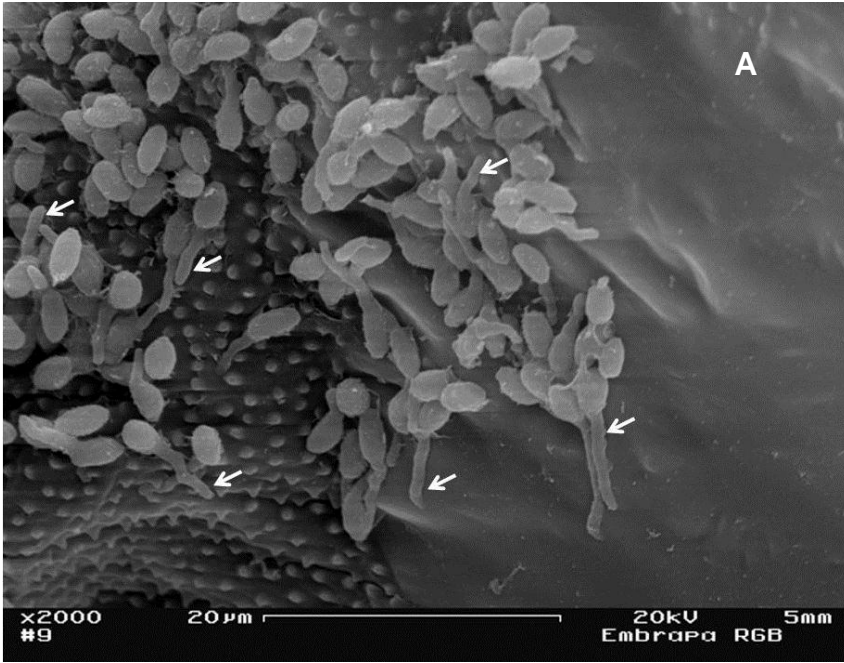
As imagens de MEV obtidas a partir das larvas mostram que as larvas possuem ornamentações diferentes e conídios aderidos à cutícula larval das duas espécies (Figura 4). Conídios em processo de germinação e crescimento do tubo germinativo podem ser observados em vários pontos na região abdominal de *M. sequax*, sobretudo após as larvas permanecerem 24 horas em contato com o inóculo (Figura 4A), fato não observado quando decorridas 24 e 48 horas após a individualização das larvas, quando muitos conídios puderam ser observados em regiões lisas e também ornamentadas da cutícula, mas sem germinação ou formação de tubo germinativo (Figura 4B). Em *R. nu*, que possui o tegumento com mais e maiores microtríquias (Figura 4C), conídios foram observados basicamente nas extremidades

dos pseudópodes após 24 horas em contato com o fungo (Figura 4D), sendo escassos os visualizados com 48 horas e praticamente nenhum conídio foi observado em 72 horas.

Tabela 3: Quantidade (em %) dos compostos lipídicos dos extratos hexânico e diclorometano-metanólico de exúvias larvais de *Mythimna sequax* e *Rachiplusia nu* identificados por GC-MS.

Composto	<i>Mythimna sequax</i>	<i>Rachiplusia nu</i>		
Hidrocarbonetos	Hexadecano	nd	6,91	
	Octadecano	nd	7,41	
	5-metil heptadecano	nd	0,15	
	3-metil nonadecano	nd	0,15	
	5-metil nonadecano	nd	0,10	
	8-metil nonadecano	nd	0,55	
	Eicosano	nd	4,79	
	Docosano	nd	2,18	
	7-metil heneicosano	nd	0,16	
	Tetracosano	nd	0,91	
	5-metil tricosano	0,51	nd	
	7-metil tricosano	nd	0,03	
	5-metil tetracosano	3,12	nd	
	Pentacosano	nd	0,05	
	Hexacosano	nd	0,05	
	3-metil hexacosano	nd	0,03	
	Heptacosano	3,75	0,55	
	Octacosano	nd	0,19	
	3-metil octacosano	nd	0,18	
	Esqualeno	nd	0,92	
	Nonacosano	14,27	0,36	
	3,11-dimetil octacosano	nd	10,80	
	11,12-dimetil nonacosano	nd	1,50	
	3,11-dimetil nonacosano	nd	0,17	
	11,12-dimetil triacontano	nd	4,68	
	11-metil nonacosano	nd	1,50	
	3-metil triacontano	nd	1,98	
	11-metil triacontano	nd	4,95	
	Heneitriacontano	16,29	1,35	
	3-metil heneitriacontano	nd	0,19	
	Dotriacontano	nd	0,36	
	3-metil dotriacontano	nd	9,95	
	Tritriacontano	nd	0,53	
11-metil tritriacontano	nd	6,07		
11,13-dimetil dotriacontano	35,95	Nd		
11-metil tetratriacontano	nd	1,40		
5,11-dimetil triacontano	nd	5,53		
5,11-dimetil dotriacontano	nd	0,66		
5,11-dimetil tetratriacontano	nd	6,34		
Aldeídos	Nonadecanal	nd	0,41	
	Ácidos graxos	Ac. Palmítico	11,96	2,25
Ac. Palmítico Ester etílico		3,06	Nd	
Ac. Linoleico metil Ester		nd	0,01	
Ác. Oleico metil Ester		nd	0,02	
Ac. Oleico		nd	Nd	
Ac. Araquidônico		5,15	Nd	
Outros		Phytol	0,85	Nd
		Vitamina E	nd	2,48
	Licoperseno	5,08	Nd	
	Pimpinellina	nd	3,32	
	Não identificados*	nd	7,90	

*correspondente a três compostos. nd: não detectado



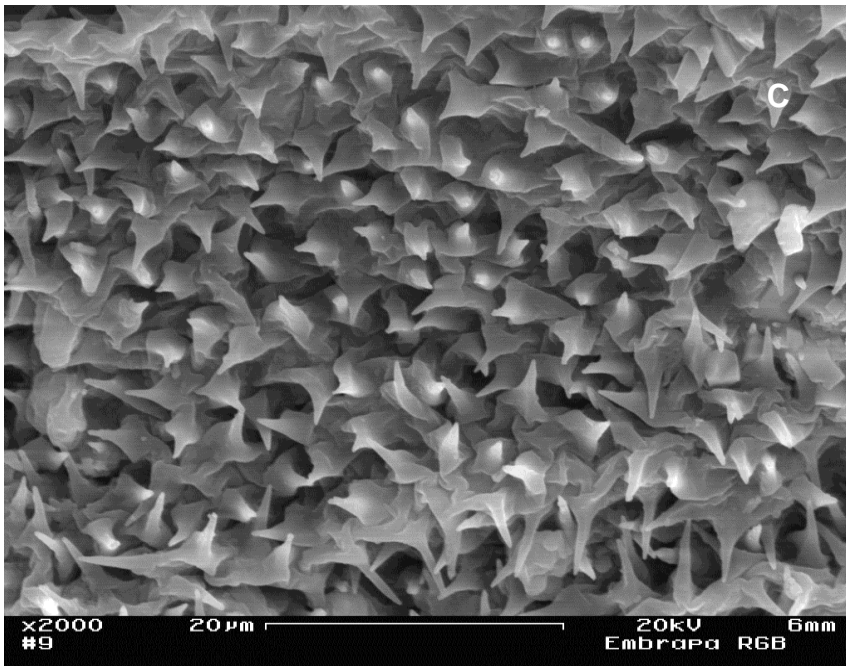


Fig. 4 Microscopia eletrônica de varredura de larvas de *Mythimna sequax* e *Rachiplusia nu* expostas a suspensão de 10^8 conídios/mL de *Nomuraea rileyi*. **A:** larvas de *M. sequax* após permanecerem 24 horas em contato com o patógeno (linhagem UB93150). As setas indicam tubos germinativos crescendo sobre a superfície larval, sem penetração no tegumento do inseto. **B:** Conídios aderidos em *M. sequax* decorridas 48 horas do contato inicial. Conídios estão presentes em regiões lisas e também em regiões ornamentadas da cutícula. **C:** Superfície cuticular de *R. nu*, com intensa presença de microtríquias. **D:** Conídios (indicados pelas setas) aderidos na extremidade de um pseudópode de *R. nu* após a larva permanecer 24 horas em contato com o inóculo.

Discussão

A susceptibilidade de *R. nu* às linhagens testadas foi menor do que a observada para *A. gemmatalis* nas mesmas condições e concentrações de inóculo [22]. Vários trabalhos demonstram resultados variáveis entre *A. gemmatalis* e outros plúsiíneos em relação a infecção por *N. rileyi*, ocorrendo maior susceptibilidade da primeira ou de

algum representante de Plusiinae [23-25]. Estes resultados também podem estar associados ao fato das linhagens serem originalmente isoladas de *A. gemmatalis* uma vez que estudos demonstram que a diversidade genética de *N. rileyi* é mais relacionada com os hospedeiros do que por aspectos geográficos [1,8] e mesmo uma certa especificidade já foi documentada [26].

Alcanos são componentes comuns em lipídios cuticulares de insetos [27] e estão presentes em grande quantidade e diversidade em *R. nu*, o que pode ser um dos fatores de patogenicidade de *N. rileyi* para esta espécie, da mesma forma como relatado para *A. gemmatalis* [22], dada sua capacidade de utilização deste tipo de composto [17]. Em *R. nu* a presença de esqualeno entre os hidrocarbonetos pode ter origem na dieta, assim como já mencionado para *A. gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* [22] e outros insetos [28]. O mesmo ocorre para a Vitamina E, que já foi identificada em larvas de lepidópteros e cuja eventual função protetora contra *N. rileyi* deve estar associada à quantidade presente na cutícula [29,30].

O fato de poucos conídios serem observados em *R. nu* pode ser explicado pelo ciclo de vida mais rápido, que leva à ecdises mais frequentes, e pelo modo de locomoção das larvas, do tipo mede-palmo, que confere menor contato abdominal com a superfície. Nesta espécie, as larvas sofrem mudas com intervalos de 2 a 3 dias [31], o que não impossibilita a contaminação, visto que as mesmas tem o hábito de comer a exuvia eliminada, o que faz com que os conídios sejam ingeridos, mantendo o andamento do processo infectivo internamente. Além disso, a mortalidade observada nos bioensaios comprova a infecção.

Diferentemente de *R. nu*, *M. sequax* não se mostrou suscetível às linhagens testadas. Como a incapacidade de adesão não é o fator chave para a não susceptibilidade de *M. sequax* à *N. rileyi* uma vez que as larvas não são imunes à adesão conidial [32], outros mecanismos devem estar envolvidos incluindo o envolvimento da composição cuticular da espécie, atuando em algum momento pré-penetração [33]. Entre os compostos lipídicos identificados em *M. sequax* destaca-se o conteúdo de ácidos graxos, que podem estar associados a ação antifúngica [34,35], o que também justificaria o fato de que, nesta espécie, conídios germinados foram observados nas primeiras 24 horas mas não nos intervalos seguintes, sugerindo algum tipo de ação fungistática.

Além disso, a pouca diversidade de hidrocarbonetos, principalmente de alcanos, pode se traduzir em dificuldades nutricionais para o crescimento fúngico [36]. Mesmo que a germinação de *N. rileyi* possa ocorrer a partir de extratos cuticulares de espécies não hospedeiras [37], a quantidade e as características dos compostos presentes podem estar associadas à susceptibilidade, uma vez que a virulência de um fungo entomopatogênico está relacionada com sua habilidade em degradar hidrocarbonetos cuticulares do inseto hospedeiro [38,39]. Hidrocarbonetos de cadeia curta como octano, descritos como inibidores de crescimento de *N. rileyi* [17] não foram identificados nas espécies avaliadas.

Respostas imunes contra *N. rileyi* são conhecidas em outras espécies [40], no entanto, se as larvas apresentam constituições lipídicas diferentes e se isso está relacionado à sua susceptibilidade ou não a *N. rileyi*, então outro ponto a ser analisado é a capacidade enzimática do patógeno. Nesse aspecto, já foi observado que o uso de uma lipase purificada aumentou consideravelmente a mortalidade larval de *Spodoptera litura* [41], o que sugere que o conhecimento da constituição cuticular do hospedeiro pode abrir novas perspectivas de uso para este patógeno.

Tendo em vista a conhecida variabilidade de *N. rileyi* [1], é um tanto difícil estimar o quanto as diferenças observadas na composição lipídica cuticular das larvas de *M. sequax* e *R. nu* estejam associadas às diferenças na susceptibilidade de uma ou outra espécie. Novos estudos devem ser conduzidos na tentativa de quantificar essas respostas e esclarecer ainda mais a interação patógeno-hospedeiro.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado (Processo: 147526/2010-8), à CAPES (Edital CGCI 29/2009 – Convocatória Programa Capes/Udelar Projetos) e à Universidad de la Republica de Uruguay - UdelaR.

Referências bibliográficas

1. Boucias DG, Tigano MS, Sosa-Gomez DR, Glare TR, Inglis PW. Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Biol. Control. 2000;19(2):124-38. doi:10.1006/bcon.2000.0857.
2. Ignoffo C. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: Burges HD, editor. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. London: Academic Press; 1981. p. 513-38.
3. Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho LPL, Batista GC, Berti Filho E et al. Entomologia Agrícola. 10 ed. São Paulo: FEALQ; 2002.
4. Allen GE, Greene GL, Whitcomb WH. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Florida. Fla. Entomol. 1971;54(2):189-91.
5. Ignoffo CM, Puttler B, Marston NL, Hostetter DL, Dickerson WA. Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria rileyi* associated with noctuid pests of soybeans. J. Invertebr. Pathol. 1975;25(1):135-7. doi:10.1016/0022-2011(75)90294-3.
6. Sosa-Gomez DR, Silva JJ. Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados., vol Documentos 188. Londrina: Embrapa Soja; 2002.
7. Humber RA, Hansen KS, Wheeler MM. Catalog of species. Ithaca: ARSef ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures; 2011. p. 517.
8. Suwannakut S, Boucias DG, Wiwat C. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. J. Invertebr. Pathol. 2005;90(3):169-76. doi:10.1016/j.jip.2005.08.010.
9. Lockey KH. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem. 1988;89(4):595-645. doi:10.1016/0305-0491(88)90305-7.
10. Guo L, Blomquist GJ. Identification, accumulation, and biosynthesis of the cuticular hydrocarbons of the southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). Arch. Insect Biochem. Physiol. 1991;16(1):19-30. doi:10.1002/arch.940160104.
11. Nelson DR, Blomquist GJ. Insect waxes. In: Hamilton RJ, editor. Waxes: chemistry, molecular biology and functions. Dundee, Scotland: The Oily Press Lipid Library; 1995. p. 349.
12. Koidsumi K. Antifungal action of cuticular lipids in insects. J. Insect Physiol. 1957;1(1):40-51. doi:10.1016/0022-1910(57)90022-7.
13. Lord JC, Howard RW. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. Mycopathol. 2004;158:211-7.
14. Sosa-Gomez DR, Boucias DG, Nation JL. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. J. Invertebr. Pathol. 1997;69(1):31-9. doi:10.1006/jipa.1996.4619.
15. Gołębowski M, Boguś MI, Paszkiewicz M, Stepnowski P. Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. Anal. Bioanal. Chem. 2011;399(9):3177-91. doi:10.1007/s00216-010-4439-4.

16. Smith RJ, Grula EA. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 1982;39(1):15-22. doi:10.1016/0022-2011(82)90153-7.
17. St. Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. J. Invertebr. Pathol. 1988;52(2):356-9. doi:10.1016/0022-2011(88)90147-4.
18. Marchioro CA, Foerster LA. Performance of the wheat armyworm, *Pseudaletia sequax* Franclemont, on natural and artificial diets. Neotropical Entomol. 2012;41:288-95. doi:10.1007/s13744-2012-0046-8.
19. Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. J. Econ. Entomol. 1976;64(4):487-8.
20. Daoust RA, Ward MG, Roberts DW. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. J. Invertebr. Pathol. 1983; 41(2):151-60. doi:10.1016/0022-2011(83)90214-8.
21. Hesse M, Meier H, Zeeh B. Espectroscopia de masas. In: Hesse M, Meier H, Zeeh B. Metodos espectroscópicos em química orgânica. 2nd ed. Valle Hermoso, Madrid: Editorial Síntesis; 1999. p. 219-311.
22. Fronza E, Specht A, Cavazzola JK, Busetti A, Heinzen H, Silva MS, de Barros NM Superfície e composição lipídica cuticular de larvas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* e sua possível influência na susceptibilidade diferencial a *Nomuraea rileyi*. 2014 (Manuscrito em fase final de preparação)
23. Boucias DG, Schoborg EA, Allen GE. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatalis*. J. Invertebr. Pathol. 1982;39(2):238-40. doi:10.1016/0022-2011(82)90017-9.
24. Ignoffo CM, Puttler B, Hostetter DL, Dickerson WA. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 1976;28(2):259-62. doi:10.1016/0022-2011(76)90132-4.
25. Puttler B, Ignoffo CM, Hostetter DL. Relative susceptibility of nine caterpillar species to the fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 1976;27(2):269-70. doi:10.1016/0022-2011(76)90157-9.
26. Moscardi F, Kastelic JG, Sosa-Gómez DR. Susceptibilidade de três espécies de lepidópteros associados à soja à três isolados do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. An. Soc. Entomol. Braz. 1992;21(2):93-100.
27. Lockey KH. Insect cuticular Hydrocarbonos. Comparative Biochemistry and Physiology. 1980;64B:457-62.
28. Juárez P, Blomquist GJ. Cuticular hydrocarbonos of *Triatoma infestans* and *T. mazzotti*. Comp. Biochem. Physiol. 1993;106B(3):667-74.
29. Fronza E, Miguez I, Specht A, de Barros NM, Heinzen H. Identification of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate from the cuticle of soybean pods armyworm (*Spodoptera cosmioides*). Nat. Prod. Res. 2013:1-4. doi:10.1080/14786419.2012.763125.
30. Fronza E, Specht A, Cavazzola JK, Cesio MV, Heinzen H, de Barros NM Concentration of vitamin E in the caterpillars' cuticle composition (Lepidoptera, Noctuoidea) and their relationship with resistance to infection by *Nomurea rileyi*. 2014. (Manuscrito em fase final de preparação)
31. Chiaravalle WR. *Rachiplusia nu* (Guenée). In: BENTANCOURT CM, SCATONI IB, editors. Lepidopteros de importância económica en Uruguay: reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur; 2006. p. 353-9.
32. Boucias DG, Pendland JC, Latgé JP. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 1988;54(7):1795-805. doi:0099-2240/88/071795-11\$02.00/0.

33. Sitch JC, Jackson CW. Pre-penetration events affecting host specificity of *Verticillium lecanii*. *Mycol. Res.* 1997;101(5):535-41.
34. Golebiowski M, Malinski E, Bougus M, Kumirska J, Stepnowski P. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2008;38:619-27. doi:10.1016/j.ibmb.2008.03.005.
35. Gołębiowski M, Cerkowniak M, Boguś MI, Włóka E, Dawgul M, Kamysz W et al. Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial activity. *J. Insect Physiol.* 2013;59(4):416-29. doi:10.1016/j.jinsphys.2013.02.001.
36. Boucias DG, Pendland JC. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 1984;43(2):288-92. doi:10.1016/0022-2011(84)90153-8.
37. Boucias DG, Latgé JP. Nonspecific induction of germination of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* with host and non-host cuticle extracts. *J. Invertebr. Pathol.* 1988;51(2):168-71. doi:10.1016/0022-2011(88)90077-8.
38. Pedrini N, Crespo R, Juárez MP. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 2007;146(1-2):124-37. doi:10.1016/j.cbpc.2006.08.003.
39. Pedrini N, Ortiz-Urquiza A, Huarte-Bonnet C, Zhang S, Keyhani NO. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* 2013;4:1-18. doi:10.3389/fmicb.2013.00024.
40. Park J-A, Kim Y. Phospholipase A2 inhibitors in bacterial culture broth enhance pathogenicity of a fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Microbiol.* 2012;50(4):644-51. doi:10.1007/s12275-012-2108-3.
41. Supakdamrongkul P, Bhumiratana A, Wiwat C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *J. Invertebr. Pathol.* 2010;105(3):228-35. doi:10.1016/j.jip.2010.06.011.

Capítulo 5

Espécies hospedeiras de *Nomuraea rileyi* e seu uso como biopesticida: fronteiras e perspectivas

Edegar Fronza^a, Alexandre Specht^b, Horacio Heinzen^c, Neiva Monteiro de Barros^a

^a*Laboratório de Controle de Pragas, Instituto de Biotecnologia – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas, Caixa Postal 1352, CEP 95070-560 Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. fronzabio@yahoo.com.br.+55 (54) 32182149*

^b*Embrapa-Cerrados BR 020 Km 18,- Caixa Postal: 08223 CEP 73310-970, Planaltina, DF – Brasil.*

^c*Facultad de Química, Catedra de Farmacognosia, Universidad de la Republica, Av. General Flores, 118000. Montevideo, Montevideo, Uruguay.*

Resumo

Nomuraea rileyi é um entomofungo que ataca larvas de lepidópteros, incluindo diversos noctuideos pragas-chave de culturas de importância agrícola. Nesta revisão são abordados aspectos históricos, interações patógeno/hospedeiro, fatores ambientais e aspectos produtivos, entre outros, referentes à pesquisa e uso deste potencial agente de controle biológico de pragas. Uma lista de espécies hospedeiras conhecidas atualmente é apresentada. Desafios visando um melhor aproveitamento deste agente são descritos e novos enfoques de pesquisa são sugeridos.

Palavras-chave: Lepidoptera, Manejo integrado de pragas, Noctuidae, virulência

Destaques:

Nomuraea rileyi é um entomofungo cosmopolita específico de lepidópteros.

Entre seus hospedeiros encontram-se pragas-chave de culturas economicamente valiosas.

Tem grande potencial para uso como ferramenta no manejo integrado de pragas agrícolas.

1. Introdução

O controle de pragas é um dos pontos mais críticos e um dos maiores desafios do agronegócio da atualidade. Anualmente, cifras milionárias são gastas na tentativa de combater espécies que se alimentam dos cultivos agrícolas, sejam grãos, frutas, pastagens ou hortaliças como fonte de alimento.

Apesar dos avanços tecnológicos relacionados ao setor agrícola, desde a mecanização, nutrição vegetal e engenharia genética, as pragas parecem estar sempre um passo à frente e nos forçam a fazer uso de qualquer ferramenta disponível que permita diminuir o impacto e as perdas nas lavouras. Entre estas ferramentas, e talvez uma das mais promissoras, está o manejo integrado de pragas, que envolve uma gama de técnicas de manejo que não apenas permite como também objetiva, simultaneamente, racionalizar o controle de pragas, manter ou aumentar os níveis de produtividade e ainda diminuir os efeitos negativos de pesticidas ao meio ambiente. Um dos pilares do manejo integrado de pragas é o controle biológico, no qual se destacam agentes patogênicos (Lacey et al. 2001).

Entre estes agentes patogênicos, destacam-se os fungos, grupo com uma notável diversidade de espécies e linhagens (Carruthers, 1991) e variada gama de hospedeiros, e que figuram entre os principais casos de sucesso em termos de controle biológico de pragas (Faria e Wraight, 2007). Fungos são agentes etiológicos de inúmeras doenças em insetos, sendo os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano de insetos. Entre estes agentes podemos citar *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson), um fungo patogênico cosmopolita que infecta diversas espécies de lepidópteros, incluindo muitas pragas agrícolas importantes (Alves, 1998; Ignoffo, 1981; Vimala Devi et al., 2003).

O objetivo desta revisão é apresentar uma compilação de dados disponíveis na literatura sobre *N. rileyi* subsidiando novos enfoques de pesquisa sobre este patógeno, que embora pouco aproveitado atualmente, não pode ser negligenciado diante da necessidade cada vez maior de dispormos de novas alternativas de controle de pragas.

2. Histórico

Nomuraea rileyi (Farlow) Samson foi descrito no final do século 19 e registrado desde o início do século 20 controlando naturalmente populações de várias espécies de lepidópteros nas culturas de soja e algodão (Allen et al., 1971; Ignoffo, 1981). Seu uso experimental para controle biológico ocorreu apenas a partir da segunda metade do século 20 (Ignoffo, 1981). O trabalho de Allen et al. (1971), realizado nos Estados Unidos, foi um dos primeiros estudos de monitoramento de epizootias de *N. rileyi* sobre a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Erebidae), um de seus hospedeiros preferenciais. Trabalhos similares foram realizados a seguir (Corrêa e Smith, 1975; Ignoffo et al., 1976a), sendo que atualmente modelos matemáticos podem fazer simulações de época de ocorrência e densidade de lagartas e conseqüentemente a ocorrência de epizootias (Sujii et al., 2002). Infecta basicamente larvas de lepidópteros, especialmente da

superfamília Noctuidae (Alves, 1998; Suwannakut et al., 2005), incluindo diversas pragas agrícolas importantes, embora alguns insetos de outras também sejam susceptíveis.

Com registros de ocorrência epizootica e identificado como um potencial agente biológico para controle da lagarta da soja *A. gemmatalis* e de plusiíneos diversos, os estudos com *N. rileyi* adquiriram maior visibilidade a partir do final dos anos 70 e início dos anos 80 (Boucias et al., 1984; Boucias e Latgé, 1988; Boucias e Pendland, 1982; Boucias e Pendland, 1984; Boucias et al., 1982; Ignoffo, 1981; Ignoffo et al., 1976a; Ignoffo et al., 1976b; Ignoffo et al., 1975).

Embora nos anos 90 tenha sido menos frequente nas publicações, estudos com este e outros agentes microbianos tem recebido cada vez mais atenção na busca de soluções ambientais relativas à produção de alimentos (Bravo et al., 2011; Hussain et al., 2010) e também porque podem se constituir em uma ferramenta muito importante para o manejo de pragas hospedeiras que desenvolvem resistência a inseticidas como *Rachiplusia nu* e *Helicoverpa armigera* (Chiaravalle, 2006; El-Latif e Subrahmanyam, 2010), e também à ação de toxinas *Bt.* em culturas geneticamente modificadas como *Spodoptera frugiperda* (Storer et al., 2012) ou ainda para uso no combinado com inseticidas, melhorando o desempenho e dificultando o surgimento de resistência aos princípios ativos disponíveis (Ambethgar, 2009).

Atualmente, outros enfoques de pesquisa relacionados à *N. rileyi* como o uso combinado de supressores imunológicos e agentes estimulantes, e aspectos moleculares estão sendo desenvolvidos com bons resultados em termos de aumento de eficiência contra hospedeiros e conhecimentos de aspectos enzimáticos e patogênicos (Devi et al., 2007; Noda et al., 2011; Nunes et al., 2010; Park e Kim, 2012; Shekharappa, 2009; Supakdamrongkul et al., 2010; Vargas et al., 2003), inclusive obtendo com sucesso produção de microesclerotias (Song et al., 2013). No entanto, o uso comercial deste agente ainda é muito restrito, estando limitado a alguns poucos países sul-americanos, e sua representatividade no mercado é praticamente insignificante (Faria e Wraight, 2007; Alves et al. 2008b; Sandhu et al., 2012).

3. Aspectos gerais

N. rileyi é cosmopolita e diversos isolados se encontram catalogados em várias partes do mundo, no entanto, geneticamente, estudos têm demonstrado que sua variabilidade é baixa, estando muito próximo dos representantes do gênero *Metarhizium* (Boucias et al., 2000; Sosa-Gómez et al., 2009), e que a diversidade genética está mais relacionada com as espécies hospedeiras do que com a localização geográficas (Suwannakut et al., 2005). Outros estudos demonstram que *N. rileyi* apresenta grande diversidade genética, inclusive entre isolados obtidos a partir de um único inseto, fato que está associado à ocorrência de recombinação (Devi et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que isolados de *N. rileyi* são mais virulentos quando aplicados em seus hospedeiros originais em comparação com outras espécies (Boucias et al., 1982, 2000; Ignoffo et al., 1976b; Moscardi et al., 1992; Tigano-Milani et al., 1995). Da mesma forma, o período necessário para germinação conidial e desenvolvimento do ciclo completo sobre o hospedeiro varia conforme o isolado e a espécie hospedeira envolvida (Srisukchayakul et al., 2005).

A manutenção dos isolados e a produção de conídios podem ocorrer via meio sem ágar, mas conídios obtidos nessas condições apresentaram perda de patogenicidade (Bell, 1975). O meio Sabouraud maltose agar suplementado com 1 ou 2% de extrato de levedura (SMAY) é um dos mais usados em laboratório, embora vários outros permitam sua germinação e crescimento e sejam adequados para estudos enzimáticos (El-Sayed et al. 1992).

A composição lipídica de *N. rileyi* é descrita como semelhante à de outros fungos como *B. bassiana*, *M. anisopliae* entre outros (Boucias et al., 1984) e o perfil proteico possui poucas proteínas identificadas (Qin et al., 2009).

Quando as linhagens são mantidas em laboratório, a patogenicidade/virulência decresce com cada transferência de meio, mas pode ser restabelecida com passagem através de insetos, em bioensaios de revigoração (Ignoffo, 1981), embora a capacidade de esporulação sobre cadáveres também seja afetada dependendo da quantidade de gerações produzidas sucessivamente em meio de cultura (Morrow et al., 1989). Condições ambientais como umidade, temperatura e luminosidade influenciam a germinação e esporulação do fungo em laboratório (Tang e Hou, 2001).

3.1 Atividade enzimática

A produção de enzimas degradadoras de cutículas é um dos fatores de patogenicidade. Entre estas enzimas encontram-se proteases, lipases, aminopeptidases, entre outras. A maioria dos fungos entomopatogênicos desenvolve apressório, estrutura parece exercer um papel importante nos primeiros estágios da infecção uma vez que apresenta elevada atividade enzimática. Em *M. anisopliae*, por exemplo, simultaneamente à formação do apressório, são produzidas endoproteases e aminopeptidases (Clarkson e Charnley, 1996). *N. rileyi*, por outro lado, não apresenta apressório, o que pode significar menor produção enzimática e conseqüentemente restringir a gama de hospedeiros.

Em seu crescimento, *N. rileyi* produz grande quantidade de polissacarídeos extracelulares (Latgé et al., 1988). Outros estudos demonstram que a expressão enzimática em *N. rileyi* é influenciada pela presença de cutículas larvais de hospedeiros como substrato quando comparado com celulose e que sua presença pode influenciar tanto o tempo como a quantidade de enzimas expressas (quitinolíticas: endoquitinases, N-acetilglicosaminidase, proteolíticas: aminopeptidases,

quimoelastase e tripsina, e pouca atividade de lipases), sendo a atividade proteolítica maior que a quitinolítica. A expressão enzimática também variou conforme a espécie utilizada no substrato (*Trichoplusia ni*, *Heliothis zea* e *H. virescens*) (El-Sayed et al., 1993). De acordo com esses autores, várias enzimas extracelulares que podem estar envolvidas na penetração do tegumento larval são expressas na germinação conidial e a expressão de proteases e quitinases foi admitida como uma provável resposta específica à presença das cutículas, tendo em vista que pouca ou nenhuma atividade foi expressa sobre celulose. Resultados similares foram descritos por Nunes et al., (2010), que verificou maior atividade enzimática de *N. rileyi* em meios com presença de substrato cuticular de *A. gemmatalis* em comparação a outros substratos. Maior atividade proteolítica e lipolítica do que chitinolítica também foi observada in vitro por Mohamed et al., (1978).

Quando uma lipase purificada foi adicionada ao patógeno contra *Spodoptera litura* a mortalidade larval aumentou consideravelmente (Supakdamrongkul, 2010), indicando que este tipo de enzima pode ter um papel subestimado na patogenicidade e virulência de *N. rileyi*, também porque lipídios cuticulares estão entre os principais constituintes da cutícula larval dos insetos (Nelson e Blomquist, 1995).

Embora infecte larvas de diversas espécies de lepidópteros como *Bombyx mori* (Saturniidae), *A. gemmatalis* (Erebidae) e vários noctuideos (Alves, 1998; Boucias et al., 1982; Boucias et al., 2000; Mohamed e Nelson, 1984; Vimala Devi et al., 2003; Ye et al., 1993), poucos são os metabólitos produzidos por *N. rileyi* já identificados. Entre estes, encontra-se o peróxido de ergosterol (Prompiboon et al., 2008) e um peptídeo cuja CL₅₀ contra larvas de terceiro instar de *A. gemmatalis* foi estimada em 0,0163 mg/mL (Onofre et al., 2002). Em *B. mori*, uma enzima específica secretada por *N. rileyi* age sobre ecdisteróides e inibe a muda larval (Kiuchi et al., 2003). A implicação de metabólitos secundários na patogênese é bem conhecida em outros entomopatógenos como *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Clarkson and Charnley, 1996).

3.2 Interações patógeno-hospedeiro

O período entre o contato inicial do patógeno com o hospedeiro, o desenvolvimento do processo infectivo e a morte do inseto dura em média 6 a 8 dias (para germinação conidial e desenvolvimento do ciclo completo sobre o hospedeiro) variando conforme o isolado e a espécie hospedeira envolvida (Srisukchayakul et al., 2005).

Uma das primeiras barreiras de defesa dos insetos é a cutícula, que por sua composição química e estrutura, pode impedir ou dificultar a adesão dos conídios, processo este que é mediado por forças hidrofóbicas (Boucias et al., 1988), embora não seja específica, isto é, conídios podem

aderir também em espécies não hospedeiras (Boucias e Latgé, 1988), podendo permanecer na superfície cuticular do inseto por até três dias (Fronza et al., 2014a)

Após a adesão, o fungo precisa atravessar a cutícula para então invadir do corpo do inseto. Essa cutícula é constituída principalmente por lipídios, cujos teores variam de espécie para espécie e suas funções são igualmente diversas (Lockey, 1988, Nelson e Blomquist, 1995). Tendo em vista que o tubo germinativo pode atravessar diretamente a cutícula ou crescer ao longo da endocutícula, entre a epiderme e a exocutícula, com a lise da endocutícula ocorrendo antes da invasão da epiderme e o desenvolvimento de corpos hifais inicia quando as hifas alcançam a hemocele (Kumar et al., 1997; Srisukchayakul et al., 2005) e que uma vez atingida a hemocele e corpos hifais formados, não há reconhecimento pelas opsoninas ou hemócitos da hemolinfa (Srisukchayakul et al., 2005), a cutícula se torna uma das principais defesas contra *N. rileyi*, embora outros mecanismos contra patógenos sejam conhecidos (Boucias e Pendland, 1987; Omoto e Alves, 1998; Park e Kim, 2012). Nesse aspecto, o uso combinado de *N. rileyi* com imunossuppressores de origem bacteriana aumentou significativamente a patogenicidade contra *Spodoptera exigua* e *Plutella xylostella*, apresentando-se como uma alternativa promissora para uso em espécies cuja resistência é baseada nas defesas celulares e humorais (Park e Kim, 2012).

A composição química cuticular pode ser responsável pela resistência de algumas espécies, como sugerido por Koidsumi (1957) em *Chilo simplex* e *Bombyx mori*, que se tornavam mais susceptíveis quando a cutícula era esfoliada. Da mesma forma, larvas de *H. virescens* que se mostraram resistentes quando expostas a um biótipo de *N. rileyi* não o foram quando blastoporos do mesmo biótipo foram injetados na hemocele (Ignoffo e Garcia, 1985).

A presença de compostos com ação antifúngica ou fungistática na cutícula pode ser uma das razões da resistência em algumas espécies. Ácidos graxos de cadeias curtas presentes na superfície larval de *H. zea*, como ácido caprílico, são apontados como responsáveis por afetar seriamente a germinação conidial de *B. bassiana* (Smith e Grula, 1982). Além de ácidos graxos, hidrocarbonetos também podem atuar diretamente na ação antifúngica. Um desses compostos, o octano, foi descrito como inibidor de crescimento tanto de *N. rileyi* como *M. anisopliae* (St. Leger et al., 1988). Também aldeídos cuticulares foram descritos como inibidores para a germinação conidial de *M. anisopliae* sobre o percevejo verde da soja *Nezara viridula* (Sosa-Gómez et al., 1997). Outro tipo de compostos cuticulares estão associadas a prevenção da adesão de conídios de varias espécies de fungos sobre *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera) (Lord e Howard, 2004). A composição lipídica da cutícula, sobretudo os ácidos graxos, também tem sido implicada na resistência de insetos a outros agentes entomopatogênicos (Golebiowski et al., 2008).

Sendo o peróxido de ergosterol (Prompiboon et al., 2008) um dos metabolitos ativos de *N. rileyi*, uma outra via de defesa pode ser a presença de compostos de natureza anti-oxidante, com possível função protetora que podem ser produzidos a partir da alimentação, conforme já descrito em *Spodoptera cosmioides*, que apresenta vitamina E entre seus lipídios cuticulares (Fronza et al. 2013) e em *Epilachna borealis* (Coleoptera) por Attygalle et al. (1996), que demonstraram que besouros desta espécie podem regular a presença da antioxidante vitamina E através da conversão de α -tocoferol proveniente da dieta a α -tocoferil acetato.

Outro viés desta questão diz respeito à composição cuticular em relação às necessidades nutricionais do patógeno. O envolvimento de lipídios cuticulares na ativação da germinação conidial durante o processo infectivo foi comprovado na espécie *A. gemmatilis* em estudos desenvolvidos por Boucias e Pendland (1984), que observaram efeitos estimulantes diferentes conforme a grupo de lipídios analisados quando comparados com extrato cuticular bruto.

Em trabalho posterior, St. Leger et al. (1988), analisando a utilização de alcanos por fungos entomopatogênicos, menciona que *N. rileyi* apresentou alto crescimento sobre cadeias C₁₁₋₁₂ e C₁₆₋₁₇. Outro fator importante observado foi que a posição do grupo metil na cadeia afeta seriamente o crescimento do fungo, ressaltando a importância da β -oxidação tendo em vista que *N. rileyi* foi capaz de utilizar 2-metil, mas não 3-metilnonano e que heptametilnonano impediu completamente seu crescimento. Da mesma forma, espécies que apresentam, além de grandes quantidades, maior diversidade de compostos se mostraram mais susceptíveis a linhagens de *N. rileyi* do que outras com pouca quantidade e ou pouca variedade de alcanos (Fronza et al., 2014a, 2014b). Ainda neste aspecto, estudos sugerem que a patogenicidade de *B. bassiana*, por exemplo, está relacionada com a sua capacidade de utilização de hidrocarbonetos (Pedrini et al., 2013).

Em estudos recentes, Noda et al., (2010a, 2010b; 2011) identificaram D-eritro-C14-esfingosina como fator de aceleração da germinação conidial de *N. rileyi* sobre *Bombix mori* e que co-fatores nitrogenados desencadeiam a germinação, sugerindo que as condições requeridas para germinação conidial não são apenas ambientais (Boucias e Pendland, 1982; Kumar et al., 1997), mas também nutricionais, que parecem ser mais complexas que em outros fungos entomopatogênicos (Boucias e Pendland, 1984, Boucias et al., 2000).

A questão nutricional precisa ser estudada mais detalhadamente, também em outras espécies. Se em algumas espécies a infecção não se materializa apenas por dificuldades nutricionais para a germinação dos conídios e crescimento do tubo germinativo, abre-se a possibilidade de uso de *N. rileyi* contra outras espécies mediante o preparo de formulações nutricionalmente enriquecidas ou também com a adição de determinadas enzimas (Supakdamrongkul, 2010).

Além disso, outro aspecto importante é a necessidade de melhor compreensão da variabilidade intraespecífica deste organismo, que faz com que diferentes linhagens apresentem diferenças na patogenicidade e na virulência contra diferentes hospedeiros e que também se comportem de modos diferentes em condições semelhantes (Boucias et al., 2000).

4. Condições ambientais para desenvolvimento de epizootias

O solo é o reservatório de inóculos do fungo, no qual a viabilidade decai gradativamente (Ignoffo et al., 1978), e as plântulas, ao germinarem, carregam os conídios para a superfície foliar, possibilitando o contato com as lagartas que se alimentam das folhas (Ignoffo, 1981).

A ocorrência do patógeno e principalmente de epizootias de *N. rileyi* é influenciada e dependente de uma série de condições abióticas e bióticas. Entre essas, destacam-se as ambientais como temperatura e umidade. O desenvolvimento de *N. rileyi* em condições de campo envolve temperaturas em torno de 25 °C e alta umidade relativa do ar (acima de 70-75%) (Allen et al., 1971; Edelstein et al., 2005; Gardner, 1985; Getzin, 1961), o que nem sempre ocorre, principalmente em regiões não tropicais, e a dispersão de conídios está diretamente relacionada com a velocidade do vento (Garcia e Ignoffo, 1977).

Além dos parâmetros temperatura e umidade, outras variáveis devem ser consideradas, como o uso de pesticidas (Horton et al., 1980). Estudos conduzidos em campo têm demonstrado que o uso de fungicidas retarda o desenvolvimento do patógeno em até três semanas (Johnson et al., 1976). Fungicidas usados para tratamento de oídio, por exemplo, influenciaram negativamente a ocorrência de *N. rileyi* no cultivo da soja sendo que em parcelas tratadas com fungicidas observou-se maior número de lagartas e atraso de até duas semanas na ocorrência da epizootia (Sosa-Gómez et al., 2003).

Allen et al., (1971) mencionam que a ocorrência de epizootias é dependente da população de hospedeiros, necessitando muitas gerações antes de haver esporos disponíveis em quantidade suficiente para contaminar um grande número de lagartas. Por outro lado, Ignoffo et al., (1976a) afirmam que uma baixa população de lagartas pode produzir conídios suficientes para manter epizootias, já que apenas uma larva de último ínstar a cada cinco linhas do cultivo podem produzir conídios em quantidades equivalentes a que aplicaram em seu estudo (10^{13} conídios/acre).

Tendo em vista o tempo necessário para o desenvolvimento do processo infectivo até a morte do hospedeiro, a eficácia no controle também é influenciada pelo estágio de desenvolvimento das lagartas, que devem estar nos instares iniciais, o que resulta em maior mortalidade e um consumo foliar bastante reduzido (Ignoffo et al., 1975; Ignoffo, 1981).

5. Espécies susceptíveis

Em comparação com outros entomofungos como *B. bassiana* ou *M. anisopliae* a gama de hospedeiros é mais restrita para *N. rileyi*, limitando-se basicamente a larvas de lepidópteros (Humber et al., 2011; Sosa-Gómez e Silva, 2002), embora alguns coleópteros (Ignoffo, 1981) e representantes de outras ordens também possam ser susceptíveis (Matter e Sabbour 2013). Nesta revisão, uma lista de espécies susceptíveis é apresentada (Tabela 1), atualizando a lista de hospedeiros para 60 espécies de lepidopteros, entre os quais estão algumas das principais pragas de culturas como algodão, girassol, milho, soja, entre outras (Bentancourt e Scatoni, 2006; Gallo et al., 2002). Paralelamente, uma lista de espécies para as quais *N. rileyi* foi testado mas que não se mostrou patogênico também é apresentada (Tabela 2).

Embora seja conhecido por atacar lagartas pertencentes a diversos gêneros como *Heliothis*, *Spodoptera*, *Chrysodeixis* (antes *Pseudoplusia*), *Rachiplusia*, entre outros (Boucias et al., 1982; Ignoffo et al., 1976b) diferenças de susceptibilidade parecem existir entre espécies do mesmo gênero, pois registros de ocorrência ou mesmo da existência de isolados a partir de espécies como, por exemplo, *S. cosmioides* e outros noctuídeos como *Mythimna* spp., *Agrotis* spp., *Mocis latipes*, entre outras, são extremamente raros ou desconhecidos (Humber et al., 2011; Sosa-Gómez e Silva, 2002). Muitas espécies de noctuídeos-praga tampouco são suscetíveis a outros entomopatógenos como, por exemplo, *B. bassiana* (Wraight et al., 2010).

A grande maioria das espécies susceptíveis pertencem à superfamília Noctuoidea e, dentro desta, muitas espécies pertencentes à Noctuidae (Tabela1), família que congrega muitas pragas-chave de culturas de elevada importância comercial (Gallo et al., 2002), o que ressalta ainda mais o potencial de uso deste biocontrolador. Além disso, entre as espécies contra as quais *N. rileyi* foi testado e não se mostrou patogênico encontram-se espécies benéficas, incluindo parasitoides e predadores (Tabela 2).

No Brasil, diversos isolados de *N. rileyi* estão catalogados em unidades da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), especialmente na Embrapa-soja e no Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN) e também em instituições de pesquisa como universidades (Universidade de Caxias do Sul, Universidade de Ijuí, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade Estadual de Londrina, Universidade Federal de Pernambuco). No entanto, a grande maioria destes isolados tem sido obtida a partir de umas poucas espécies de hospedeiros, destacando-se *A. gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* (Sosa-Gómez e Silva, 2002; Humber et al., 2011).

Tabela 1: Artrópodes e insetos susceptíveis ao fungo *Nomuraea rileyi*. Local, cultura de origem das larvas (quando identificada) e/ou uso em testes de laboratório e referências são apresentadas.

Família - Subfamília	Espécie	País	Cultura	Referências
Ixodida (Acari)				
Ixodidae Rhipicephalinae	<i>Rhipicephalus microplus</i> (Canestrini, 1888)	Brasil	Laboratório	Perinotto et al. 2012
Hemiptera				
Delphacidae	<i>Sogatella furcifera</i> (Horváth, 1899)	EUA		Humber et al., 2011
Aleyrodidae	<i>Bemisia tabaci</i> (Genadius, 1889)	Egito	Tomate	Matter e Sabbour, 2013
Aphididae	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer, 1776)	Egito	Tomate	Matter e Sabbour 2013
Coleoptera				
Curculionidae	<i>Hypera punctata</i> (Fabricius, 1775)	EUA	Trevo	Ignoffo, 1981
Chrysomelidae	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say 1824)		Laboratório	Fargues, 1976
Scarabaeidae	<i>Popillia japonica</i> Newman, 1841		Laboratório	Julian et al., 1982
Lepidoptera				
Gracillaroidea				
Gracillariidae	<i>Acrocercops tenera</i> Meyrick, 1914	India	Espécies florestais	Sandhu et al., 1993
Yponomeutoidea				
Plutellidae	<i>Plutella xylostella</i> (Linnaeus, 1758)	China	Laboratório	Jun, 2000
Hyblaeoidea				
Hyblaeidae	<i>Hyblaea puera</i> (Cramer, 1777)	India	Espécies florestais, teca	Sandhu et al. 1993
Pyraloidea				
Crambidae Crambinae	<i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius, 1794)	Brasil	Cana-de-açúcar	Alves, 1998; Romero et al., 2008
Crambidae Evergestinae	<i>Evergestis forficalis</i> (Linnaeus, 1758)		Natural	Ignoffo, 1981
Pyralidae Galerinae	<i>Stenachroia elongella</i> Hampson, 1898	India	Laboratório, sorgo	Phadke e Rao, 1978
Crambidae Nymphulinae	<i>Paraponyx stratiotata</i> Linnaeus, 1758			Svinningen et al., 2010
Crambidae Pyraustinae	<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker 1859	Japão	Natural, amoreira	Ignoffo, 1981
Crambidae Pyraustinae	<i>Eutectona machaeralis</i> (Walker, 1859)	India	Teca	Ali et al., 2002
Crambidae Pyraustinae	<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner, 1796)	USA	Natural, milho	Ignoffo, 1981
Crambidae Pyraustinae	<i>Ostrinia furnacalis</i> (Guenée, 1854)			Saito e Oku, 1985
Crambidae Pyraustinae	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i> (Guenée, 1854)	Filipinas		Humber et al., 2011
Bombycoidea				
Bombycidae	<i>Bombix mori</i> (Linnaeus, 1758)	Japão	Laboratório	Alves, 1998; Humber et al. 2011
Hesperioidea				
Hesperiidae - Hesperinae	<i>Panoquina</i> sp.	Colombia	Arroz	Vargas e Sanchez ,1983
Papilionoidea				
Nymphalidae	<i>Chlosyne lacinia saundersii</i> (Doubleday,	Argentina		Sosa-Gómez et al., 2010

	[1847])			
Nymphalidae	<i>Junonia orithyia</i> Linnaeus, 1764	India	Espécies florestais	Sandhu et al. 1993
Noctuoidea				
Erebidae Erebiniae	<i>Achaea janata</i> (Linnaeus, 1758)	India		Phadke e Rao, 1978
Erebidae Scolioteryginae	<i>Alabama argilacea</i> (Hübner, 1823)	Brasil	Algodão	Sosa-Gomez and Silva, 2002
Erebidae Eulepidotinae	<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner, 1818	Brasil, EUA	Soja, feijão	Ignoffo, 1981
Erebidae Arctiinae	<i>Hyphantria cunea</i> (Drury, 1773)	Japão	Natural, amoreira	Ignoffo, 1981
Erebidae Hypocalinae	<i>Hypocala rostrata</i> (Fabricius, 1794)	India	Espécies florestais	Vimala e Prasad, 2001
Erebidae Lymantriinae	<i>Lymantria dispar</i> (Linnaeus, 1758)	EUA	Laboratório	Wasti e Hartmann, 1978
Erebidae Erebiniae	<i>Mocis undata</i> (Fabricius, 1775)	India	Espécies florestais	Vimala e Prasad, 2001
Erebidae Erebiniae	<i>Mocis frugalis</i> (Fabricius, 1775)	India		Humber et al., 2011
Nolidae Chloephorine	<i>Xanthodes graellsii</i> (Feisthmel, 1837)	India		Vimala e Prasad, 2001
Erebidae Hypeninae	<i>Hypena scabra</i> (Fabricius, 1798)	EUA	Laboratório	Ignoffo, 1981; Puttler et al., 1976;
			Natural, soja	Thorvilson et al., 1985
Erebidae Rivulinae	<i>Rivula atimeta</i> (Swinhoe, 1905)	Filipinas		Humber et al., 2011
Erebidae Rivulinae	<i>Rivula biatomea</i> (Moore, 1883)	Taiwan	Bambu	Chang and Fan, 1991
Erebidae Arctiinae	<i>Spilosoma obliqua</i> Walker, 1855	India	Laboratório	Mathew et al., 1998
Erebidae Arctiinae	<i>Spilosoma virginica</i> Fabricius (1798)	Argentina		Sosa-Gómez et al. 2010
Noctuidae Acontiinae	<i>Naranga</i> sp.	Indonésia		Humber et al., 2011
Noctuidae Plusiinae	<i>Trichoplusia orichalcea</i> (Fabricius, 1775)	New Zealand	Leguminosas e Brassicaceae	Hill et al., 1987
Noctuidae Plusiinae	<i>Trichoplusia ni</i> (Hübner, [1803])	Brasil, EUA, Rep. Dominicana, Tailândia	Couve/repolho, soja Algodão, laboratório	Alves, 1998; Behnke e Paschke, 1966; Vimala e Prasad, 2001
Noctuidae Plusiinae	<i>Crhysodeixis includens</i> (Walker, [1858])	EUA	Algodão, soja, laboratório	Boucias et al., 1982; Gudauskas e Canerday, 1966; Harper e Carner, 1973
Noctuidae Plusiinae	<i>Rachiplusia nu</i> (Guenée, 1852)	Brasil		Sosa-Gomez e Silva, 2002
Noctuidae Plusiinae	<i>Chrysodeixis acuta</i> (Walker, [1858])	India	Soja	Gupta, 2003
Noctuidae Plusiinae	<i>Chrysodeixis eriosoma</i> (Doubleday, 1843)	Ceilão	Couve/repolho	Vimala e Prasad, 2001
Noctuidae Heliiothinae	<i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1809)	Austrália África	Laboratório Algodão	Holdom e van de Klashorst, 1986 Vimala e Prasad, 2001
Noctuidae Heliiothinae	<i>Helicoverpa punctigera</i> (Wallengren, 1860)	Austrália	Laboratório	Holdom e van de Klashorst, 1986
Noctuidae Heliiothinae	<i>Helicoverpa zea</i> (Boddie, 1850)	Brasil, EUA	Natural, alfafa, algodão, milho, soja	Alves, 1998; Boucias et al., 1982; Ignoffo e Garcia, 1985; Smith et al, 1976
Noctuidae Heliiothinae	<i>Heliothis subflexa</i> (Guenée, 1852)	EUA	Laboratório	Ignoffo e Garcia, 1985
Noctuidae Heliiothinae	<i>Heliothis virescens</i> (Fabricius, 1777)	EUA	Algodão, soja, laboratório	Puttler et al., 1976
Noctuidae Agaristinae	<i>Aucula magnifica</i> (Schaus, 1904)	Brasil	Natural	Poletto et al., 2010
Noctuidae Noctuiniae	<i>Spodoptera litura</i> (Fabricius, 1775)	India	Natural, tabaco	Vimala Devi, 1994; Rao e Phadke, 1977
Noctuidae Noctuiniae	<i>Spodoptera ornithogali</i> (Guenée, 1852)	USA	Natural	Ignoffo, 1981

Noctuidae Noctuinae	<i>Spodoptera exigua</i> (Hübner, 1808)	EUA India	Laboratório, natural, grama e painço	Boucias et al., 1982; Phadke et al., 1978
Noctuidae Noctuinae	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797)	Brasil, Colombia, Equador, EUA	Milho, laboratório	Alves, 1998; Boucias et al., 1982; Ignoffo e Garcia, 1985
Noctuidae Noctuinae	<i>Spodoptera litoralis</i> (Boisduval, 1833)	Israel e Madagascar	Natural, algodão	Ignoffo, 1981
Noctuidae Noctuinae	<i>Mythimna sequax</i> (Franclemont, 1951)	Brasil		Sosa-Gomez e Silva, 2002
Noctuidae Noctuinae	<i>Mithymna unipuncta</i> (Haworth, 1809)	EUA, Japan	Natural, arroz	Ignoffo, 1981
Noctuidae Noctuinae	<i>Peridroma saucia</i> (Hübner, 1808)	EUA	Laboratório, soja	Alves, 1998; Puttler et al., 1976
Noctuidae Noctuinae	<i>Feltia jaculifera</i> (Guenée, 1852) = <i>Feltia ducens</i> Walker	USA	Laboratório	Crumb, 1929
Noctuidae Noctuinae	<i>Agrotis gladiaria</i> Morrison, 1875	USA	Laboratório	Crumb, 1929
Noctuidae Noctuinae	<i>Agrotis ipsilon</i> (Hufnagel, 1776)	India, USA	Laboratório, natural	Alves, 1998; Ignoffo, 1981
Noctuidae Noctuinae	<i>Panolis flammea</i> (Dennis & Schiffmiller, 1775)	UK	Pinus	Hicks e Watt 2000
Noctuidae Noctuinae	<i>Agnorisma badinodis</i> (Grote, 1874)	USA		Crumb, 1929
Noctuidae Noctuinae	<i>Leucania latiuscula</i> Herrich-Schäffer, 1868	Brasil	Cana-de-açúcar	Alves, 1998
Noctuidae Noctuinae	<i>Cosmia</i> sp. nr. <i>C. exigua</i> (Butler, 1881)	Fiji	Natural	Ignoffo, 1981
Noctuidae Noctuinae	<i>Tiracola plagiata</i> (Walker, 1857)	Papua	Cacau	Catley, 1962
Noctuidae Noctuinae	<i>Mamestra brassicae</i> Linnaeus 1758	França	Laboratório	Maniania e Fargues, 1992

Tabela 2: Espécies de insetos nas quais *Nomuraea rileyi* foi testado, mas que não se mostraram susceptíveis.

Familia	Espécie	País	Cultura	Referências
Coleoptera				
Curculionidae	<i>Hypera punctata</i> (Fabricius, 1775)	EUA	Clover	Ignoffo, 1981
Curculionidae	<i>Hypera postica</i> (Gyllenhal, 1813)			Ignoffo, 1981
Scarabaeidae	<i>Cetonia aurata</i> (Linnaeus, 1758)			Fargues, 1976; Ignoffo, 1981
Curculionidae	<i>Chalcodermus aeneus</i> Boheman, 1837			Bell e Hamalle, 1970; Ignoffo, 1981
Coccinellidae	<i>Hippodamia convergens</i> Guerin-Meneville, 1842			Ignoffo, 1981
Scarabaeidae	<i>Melolontha melolontha</i> (Linnaeus, 1758)			Fargues, 1976
Dynastidae	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Linnaeus, 1758)			Fargues, 1976;
Tenebrionidae	<i>Tenebrio molitor</i> Linnaeus, 1758			Ignoffo, 1981
Tenebrionidae	<i>Tribolium confusum</i> Jacquelin du Val, 1868			Ignoffo, 1981
Diptera				
Glossinidae	<i>Glossina morsitans</i> Westwood, 1850			Ignoffo, 1981
Tachinidae	<i>Voria ruralis</i> (Fallén, 1810)			Ignoffo, 1981
Hymenoptera				
Braconidae	<i>Cotesia marginiventris</i> (Cresson, 1865)			Ignoffo, 1981
Scelionidae	<i>Telenomus proditor</i> Nixon, 1937	India		Phadke e Rao, 1978
Lepidoptera				
Sphingoidea				
Sphingidae	<i>Manduca sexta</i> (Linnaeus, 1764)			Ignoffo, 1981
Sphingidae	<i>Manduca quinquemaculata</i> (Haworth, 1803)			Ignoffo, 1981
Papilionoidea				
Pieridae	<i>Pieris rapae</i> (Linnaeus, 1758)			Puttler et al., 1976
Pyraloidea				
Pyralidae Phycitinae	<i>Plodia interpunctella</i> (Hübner, [1813])			Ignoffo, 1981

6. Produção massal e formulações

Conídios são o ponto de partida da infecção. O uso e aplicação de outras estruturas, como corpos hifais, foi testado mas não se mostrou alternativa promissora (Holdom e van de Klashorst, 1986).

Em virtude de sua grande variabilidade, a produção massal e a elaboração de formulações para uso comercial estão entre os principais desafios para o desenvolvimento de biopesticidas à base de *N. rileyi*.

A produção de conídios em meios SMAY com o objetivo de produção comercial é inviável técnica e economicamente. Neste sentido o uso de substratos sólidos como arroz parece ser uma alternativa interessante, de fácil obtenção, manejo e com possibilidade de produção em larga escala (Méndez et al., 2010). Outros meios incluindo, além do arroz, outros grãos como trigo e sorgo e também banana e batata, foram testados por Thakre et al. (2011), obtendo melhores resultados com arroz e banana em 7 a 11 dias após a incubação. Também sorgo esmagado, com adição de 1% de estrato de levedura se mostrou adequado para o cultivo (Vimala Devi, 1994).

Após a produção em larga escala, se faz necessário obter formulados estáveis por um período razoável de tempo, o que ainda é um gargalo. Embora produtos comerciais a base de arroz sejam comuns para outros fungos e a quantidade e o volume ocupado podem dificultar o manuseio, transporte e preparação, a produção de conídios em arroz, seguida de formulação em óleo, a exemplo do que já ocorre com outros fungos (Alves e Faria, 2010; Alves et al., 2008a) é uma alternativa a ser considerada. No entanto, o tipo de óleo utilizado pode acarretar em efeitos diferentes de *N. rileyi* sobre o inseto alvo (Vega-Aquino et al., 2010) embora já tenha sido usado combinado com óleos vegetais ou mesmo com alguns extratos vegetais deterrentes, sem comprometer sua patogenicidade (Vimala Devi e Prasad, 1996). No caso de formulações líquidas, estas podem ter a qualidade influenciada pelo pH, que deve estar entre 5 e 7 (Aguirre et al., 2009).

Formulações granulares, que podem conferir proteção contra radiação UV e ainda servir como substrato de crescimento podem ser viáveis, a exemplo do uso de gérmen de milho desengordurado, no entanto este substrato também é adequado para crescimento de outros fungos produtores de micotoxinas, como *Aspergillus flavus* (Pavone et al., 2009).

Outro ponto importante diz respeito à armazenagem, visto que isso permite suportar e também atender eventuais oscilações de demanda e as condições de armazenamento podem alterar sensivelmente a viabilidade do produto (Lopes e Barros, 1995; Silva e Loch, 1993). A crioconservação foi testada como forma de conservação mantendo a qualidade do inóculo por até 18 meses, sem afetar a germinação e a patogenicidade (Torres e Cotes, 2005).

O uso profilático já foi sugerido no passado, tendo em vista que uma aplicação de conídios pode antecipar o desenvolvimento de epizootias em cerca de duas semanas (Ignoffo et al., 1976a) o que é um tempo considerável comparado à duração da fase larval dos principais hospedeiros e a quantidade de alimento consumida pelas larvas nos últimos instares. No entanto, para que um produto realmente seja eficaz, aspectos não apenas comerciais precisam ser considerados, mas também toda a gama de conhecimentos disponíveis sobre a ecologia e as diversas interações possíveis entre o patógeno e seu (ou seus) hospedeiros (Jackson et al., 2010).

Considerações finais

Vários avanços na pesquisa com *N. rileyi* estão contribuindo para o conhecimento de diversos aspectos relacionados ao patógeno e suas interações com os insetos hospedeiros. Provavelmente, a diversidade genotípica do patógeno e as características cuticulares específicas dos insetos são as causas das diferenças de patogenicidade entre os hospedeiros. O potencial deste entomofungo é indiscutível e o esclarecimento destes fatores pode elevar o status de *N. rileyi* no controle de pragas. A seleção e melhoramento de linhagens comportamentalmente mais estáveis e específicas para diferentes espécies de larvas devem ser levados em conta. A realização de avaliações em campo pode contribuir para aumentar a gama de espécies sujeitas ao controle por este entomopatógeno bem como fornecer novos dados bioecológicos que proporcionem melhor domínio e uso deste organismo.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo suporte financeiro (Processo: 147526/2010-8), à CAPES (Edital CGCI 29/2009 – Convocatória Programa Capes/Udelar Projetos) e à Universidad de la Republica – UdelaR - do Uruguay.

Referências

- Aguirre, N., Villamizar R, L., Espinel C, C., Cotes P, M., 2009. Efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). Rev. Colomb. Entomol. 35, 138-144.
- Ali, M.S., Alam, T., Sattar, A., 2002. Studies on population fluctuation of *Eutectona machaeralis* Walker on teak saplings in north Bihar. Shashpa 9(2): 139-142.
- Allen, G.E., Greene, G.L., Whitcomb, W.H., 1971. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Florida. Fla. Entomol. 54, 189-191.

- Alves, R.T., Faria, M., 2010. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. Embrapa Cerrados, Planaltina.
- Alves, S.B., 1998. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B., (Ed.), Controle microbiano de insetos. FEALQ, Piracicaba, pp. 289-381.
- Alves, S.B., Leite, L.G., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Marques, E.J. 2008a. Produção massal de fungos entomopatogênicos América Latina. In: Alves, S.B., Lopes, R.B., Eds.), Controle Microbiano de pragas na America Latina: avanços e desafios. FEALQ, Piracicaba, pp. 414.
- Alves, S.B., Lopes, R.B., Vieira, S.A., Tamai, M.A., 2008b. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Alves, S.B., Lopes, R.B., Eds.), Controle Microbiano de pragas na America Latina: avanços e desafios. FEALQ, Piracicaba, pp. 414.
- Ambethgar, V., 2009. Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. *J. Biopestic.* 2, 177-193.
- Attygalle, A.B., Meinwald, J., Rossini, C., Eisner, T., 1996. Acetylation of a-tocopherol by the squash beetle, *Epilachna borealis* defense mechanisms of arthropods, 134 [1]. *Naturwissenschaften* 83, 277-279.
- Behnke, C.N., Paschke, J.D., 1966. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles and *Aspergillus flavus* Link, entomogenous fungi of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner), in Indiana and Wisconsin. *J. Invertebr. Pathol.* 8, 103-108.
- Bell, J.V., 1975. Production and pathogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid media. *J. Invertebr. Pathol.* 26, 129-130.
- Bell, J.V., Hamalle, R.J., 1970. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 447-450
- Bentancourt, C.M., Scatoni, I.B. 2006. Lepidópteros de importancia económica em Uruguay: reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Boucias, D.G., Brasaemle, D.L., Nation, J.L., 1984. Lipid composition of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 43, 254-258.
- Boucias, D.G., Latgé, J.P., 1988. Nonspecific induction of germination of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* with host and non-host cuticle extracts. *J. Invertebr. Pathol.* 51, 168-171.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1982. Ultrastructural studies on the fungus, *Nomuraea rileyi*, infecting the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *J. Invertebr. Pathol.* 39, 338-345.

- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1984. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 43, 288-292.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1987. Detection of protease inhibitors in the hemolymph of resistant *Anticarsia gemmatalis* which are inhibitory to the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Experientia 43, 336-339.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., Latgé, J.P., 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1795-1805.
- Boucias, D.G., Schoborg, E.A., Allen, G.E., 1982. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsa gemmatalis*. J. Invertebr. Pathol. 39, 238-240.
- Boucias, D.G., Tigano, M.S., Sosa-Gomez, D.R., Glare, T.R., Inglis, P.W., 2000. Genotypic Properties of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi*. Biol. Control 19, 124-138.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem. Mol. Biol. 41, 423-431.
- Carruthers, R.I., Sawyer, A.J., Hural, K., 1991. Use of fungal pathogens for biological control of insect pests. In: Rice, B.J., (Ed.), Suitable agriculture research and education in the field: a proceedings. National Academic Press, Washington 336-369
- Catley, A., 1962. *Tiracola plagiata* Walk. (Lepidoptera: Noctuidae), a serious pest of cacao in Papua. P. N. G. Agric. J. 15, 15-22.
- Chang, Y.-C., Fan, Y.-B., 1991. Outbreak, morphology and bionomics of *Rivula biatomea* (Moore) (Noctuidae, Lepidoptera), with pathogenicity of entomogenous fungi to its larva. Bull. Taiwan For. Res. Inst. 6, 99-106.
- Chiaravalle, W.R., 2006. *Rachiplusia nu* (Guenée). In: Bentancourt, C.M., Scatoni, I.B. (Eds.), Lepidopteros de importância econômica em Uruguay: reconhecimento, biologia y daños de las plagas agrícolas y forestales. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp. 353-359.
- Clarkson, J.M., Charnley, A.K., 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends Microbiol. 4, 197-203.
- Corrêa, B.S., Smith, J.G., 1975. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Paraná, Brazil. Fla. Entomol. 58, 280.
- Crumb, S.E., 1929. Tobacco cutworms. US Dep. Agric. Tech. Bull. 88, 1-179.

- Devi, U.K., Reineke, A., Rao, U.C.M., Reddy, N.R.N., Khan, A.P.A., 2007. AFLP and single-strand conformation polymorphism studies of recombination in the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Mycol. Res. 111, 716-725.
- Edelstein, J.D., Trumper, E.V., Lecuona, R.E., 2005. Temperature-dependent development of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) larvae (Lepidoptera: Noctuidae). Neotropical Entomol. 34(4), 593-399.
- El-Latif, A.O.A., Subrahmanyam, B., 2010. Pyrethroid resistance and esterase activity in three strains of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). Pestic. Biochem. Physiol. 96, 155-159.
- El-Sayed, G.N., Ignoffo, C.M., Leathers, T.D., Gupta, S.C., 1992. A semi-defined medium for culturing *Nomuraea rileyi*. Mycopathol. 118, 163-165.
- El-Sayed, G.N., Ignoffo, C.M., Leathers, T.D., Gupta, S.C., 1993. Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Mycopathol. 122, 79-87.
- Fargues, J., 1976. Specificity of fungi imperfecti (Hyphomycetes) pathogenic for the larvae of Coleoptera (Scarabaeidae and Chrysomelidae). Entomophaga 21 (3): 313-323
doi 10.1007/BF02371768
- Faria, M.R., Wraight, S.P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control 43, 237-256.
- Fronza, E., Miguez, I., Specht, A., de Barros, N.M., Heinzen, H., 2013. Identification of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate from the cuticle of soybean pods armyworm (*Spodoptera cosmioides*). Nat. Prod. Res. 1-4.
- Fronza, E., Specht, A., Cavazzola, J.K., Buseti, A., Heinzen, H., Silva, M.S., Barros, N.M.d., 2014a. Superfície e composição lipídica cuticular de larvas de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* e sua possível influência na susceptibilidade diferencial a *Nomuraea rileyi*. Manuscrito em preparação
- Fronza, E., Specht, A., Cavazzola, J.K., Tomasi, R.J., Heinzen, H., Barros, N.M.d., 2014b. Superfície e composição lipídica cuticular larval de *Mythimna sequax* e *Rachiplusia nu* e susceptibilidade à *Nomuraea rileyi*. Manuscrito em preparação
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, L.P.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramini, J.D., 2002. Entomologia Agrícola. FEALQ, São Paulo.

- Garcia, C., Ignoffo, C.M., 1977. Dislodgment of conidia of *Nomuraea rileyi* from cadavers of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 30, 114-116.
- Gardner, W.A., 1985. Effects of temperature on the susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 46, 348-349.
- Getzin, L.W., 1961. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hubner). J. Invertebr. Pathol. 3, 2-10.
- Golebiowski, M., Malinski, E., Bougus, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., 2008. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. Insect Biochem. Mol. Biol. 38, 619-627.
- Gudauskas, R.T., Canerday, T.D., 1966. Pathogenicity of *Spicaria rileyi* to *Pseudoplusia includens*. J. Invertebr. Pathol. 8, 277.
- Gupta, V.P. 2003. Natural occurrence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* in the soybean green semilooper, *Chrysodeixis acuta*, in India. Plant Health Prog. 1-2. doi:10.1094/PHP-2003-0113-01-HN.
- Harper, J.D., Carner, G.R., 1973. Incidence of Entomophthora sp. and other natural control agents in populations of *Pseudoplusia includens* and *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 22, 80-85.
- Hicks, B.J., Watt, A.D., 2000. Fungal disease and parasitism in *Panolis flammea* during 1998: evidence of change in the diversity and impact of the natural enemies of a forest pest. For. Oxf. 73, 31-36.
- Hill, M.G., Cameron, P.J., Dugdale, J.S., Allan, D.J., Walker, G.P., 1987. Biology of *Thysanoplusia orichalcea* (Lepidoptera: Noctuidae) in New Zealand. N. Z. Entomol. 10, 44-50.
- Holdom, D.G., van de Klashorst, G., 1986. Sporulation by hyphal bodies of *Nomuraea rileyi* and subsequent infection of *Heliothis* spp. J. Invertebr. Pathol. 48, 242-245.
- Horton, D.L., Carner, G.R., Turnipseed, S.G., 1980. Pesticide inhibition of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* in soybeans. Environ. Entomol. 9, 304-308.
- Humber, R.A., Hansen, K.S., Wheeler, M.M., 2011. Catalog of species. ARSef ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Ithaca, pp. 517.
- Hussain, A., Tian, M.-Y., He, Y.-R., Lei, Y.-Y., 2010. Differential fluctuation in virulence and VOC profiles among different cultures of entomopathogenic fungi. J. Invertebr. Pathol. 104, 166-171.
- Ignoffo, C.M., 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: Burges, H.D., (Ed.), Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press, London, pp. 513-538.

- Ignoffo, C.M., Garcia, C., Hostetter, D.L., Pinnell, R.E., 1978. Stability of conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, in and on soil. *Environ. Entomol.* 7, 724-727.
- Ignoffo, C.M., Garcia, C., 1985. Host spectrum and relative virulence of an Ecuadoran and a Mississippian biotype of *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 45, 346-352.
- Ignoffo, C.M., Marston, N.L., Hostetter, D.L., Puttler, B., Bell, J.V., 1976a. Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. *J. Invertebr. Pathol.* 27, 191-198.
- Ignoffo, C.M., Puttler, B., Hostetter, D.L., Dickerson, W.A., 1976b. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 28, 259-262.
- Ignoffo, C.M., Puttler, B., Marston, N.L., Hostetter, D.L., Dickerson, W.A., 1975. Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria rileyi* associated with noctuid pests of soybeans. *J. Invertebr. Pathol.* 25, 135-137.
- Jackson, M.A., Dunlap, C.A., Jaronski, S.T., 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol* 55, 129-145. doi 10.1007/s10526-009-9240-y
- Johnson, D.W., Kish, L.P., Allen, G.E., 1976. Field evaluation of selected pesticides on the natural development of the entomopathogen, *Nomuraea rileyi*, on the velvetbean caterpillar in soybean. *Environ. Entomol.* 5, 964-966.
- Julian, G.S., Toolan, S.C., Detroy, R.W., Stern, N., 1982. Infectivity of *Nomuraea rileyi* conidia to *Popillia japonica* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 39, 253-254.
- Jun, M.A., 2000. Laboratory susceptibility of *Plutella xylostella* to *Metarhizium anisopliae* and *Nomuraea rileyi*. *Entomol. Sin.* 7(1), 53-57.
- Kiuchi, M., Yasui, H., Hayasaka, S., Kamimura, M., 2003. Entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* inhibits host insect molting by C22-oxidizing inactivation of hemolymph ecdysteroids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 52, 35-44.
- Koidsumi, K., 1957. Antifungal action of cuticular lipids in insects. *J. Insect Physiol.* 1, 40-51.
- Kumar, V., Singh, G.P., Kumar, V., Babu, A.M., Datta, r.k., 1997. SEM study on the invasion of *Nomuraea rileyi* (Farlow) on silkworm, *Bombyx mori* Linn. causing green muscardine. *Mycopathol.* 138, 141-144.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biol. Control* 21, 230-248.
- Latgé, J.-P., Boucias, D.G., Fournet, B., 1988. Structure of the exocellular polysaccharide produced by the fungus, *Nomuraea rileyi*. *Carbohydr. Res.* 181, 282-286.

- Lockey, K.H., 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.* 89, 595-645.
- Lopes, M.I.L., Barros, N.M.d., 1995. Virulência de conídios armazenados do fungo *Nomuraea rileyi* à lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. *Ciênc. Rural* 25, 197-200.
- Lord, J.C., Howard, R.W., 2004. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathol.* 158, 211-217.
- Maniania, N.K., Fargues, J., 1992. Susceptibility of *Mamestra brassicae* (L.) and *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae (Lep., Noctuidae) to the hyphomycetes *Paecilomyces fumosoroseus* (Brown and Smith) and *Nomuraea rileyi* (Samson) at two temperatures. *J. Appl. Entomol.* 113 (5): 518-524. doi 10.1111/j.1439-0418.1992.tb00698.x
- Mathew, S.O., Sandhu, S.S., Rajak, R.C., 1998. Bioactivity of *Nomuraea rileyi* against *Spilosoma oblique*: effect of dosage, temperature and relative humidity. *J. Indian Bot. Soc.* 77, 23-25.
- Matter, M.M., Sabbour, M.M., 2013. Differential efficacies of *Nomuraea rileyi* and *Isaria fumosorosea* on some serious pests and the pests' efficient predator prevailing in tomato fields in Egypt. *J. Plant Prot. Res.* 53, 103-109.
- Méndez, A., del Pozo, E., Garcia, I., Gonzáles, A., 2010. Evaluación de sustratos sólidos para la producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Rev. Prot. Veg.* 25, 108-112.
- Mohamed, A.K.A., Nelson, F.R.S., 1984. Toxic effects of *Nomuraea rileyi* extract on *Heliothis* spp. *J. Agric. Entomol.* 1, 349-353.
- Mohamed, A.K.A., Sikorowski, P.P., Bell, J.V., 1978. Histopathology of *Nomuraea rileyi* in larvae of *Heliothis zea* and in vitro enzymatic activity. *J. Invertebr. Pathol.* 31, 345-352.
- Morrow, B.J., Boucias, D.G., Heath, M.A., 1988. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*, after serial in vitro passage. *J. Econ. Entomol.* 82(2), 404-407.
- Moscardi, F., Kastelic, J.G., Sosa-Gómez, D.R., 1992. Susceptibilidade de três espécies de lepidópteros associados à soja à três isolados do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *An. Soc. Entomol. Braz.* 21, 93-100.
- Nelson, D.R., Blomquist, G.J., 1995. Insect waxes. In: Hamilton, R.J., (Ed.), *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. The Oily Press Lipid Library, Dundee, Scotland, pp. 349.
- Noda, T., Ono, M., Iimure, K., Araki, T., 2010a. Characterization of a germination-accelerating factor from the silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1226-1230.

- Noda, T., Ono, M., Iimure, K., Araki, T., 2010b. Isolation of a bioactive substance from the silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) that accelerates the germination of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 563-568.
- Noda, T., Satoh, T., Iimure, K., Ono, M., Araki, T., 2011. The effect of amino acids on the C14-sphingosine-triggered germination of *Nomuraea rileyi*, and surface amino acids on *Spodoptera litura* Fabricius. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 771-773.
- Nunes, A.R.F., Martins, J.N., Furlaneto, M.C., Barros, N.M., 2010. Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis*. *Ciênc. Rural* 40, 1853-1859.
- Omoto, C., Alves, S.B., 1998. Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos. In: Alves, S.B., (Ed.), *Controle microbiano de insetos*. FEALQ, Piracicaba, pp. 55-73.
- Onofre, S.B., Gonzales, R.R., Messias, C.L., Azevedo, J.L., Barros, N.M., 2002. LC₅₀ of the peptide produced by the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson against third instar larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45, 269-275.
- Park, J.-A., Kim, Y., 2012. Phospholipase A2 inhibitors in bacterial culture broth enhance pathogenicity of a fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Microbiol.* 50, 644-651.
- Pavone, D., Díaz, M., Trujillo, L., Dorta, B., 2009. A granular formulation of *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia* 34, 130-134.
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonet, C., Zhang, S., Keyhani, N.O., 2013. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* 4 - 24 doi 10.3389/fmicb.2013.00024
- Perinotto, W.M.S., Terra, A.L.M., Angelo, I.C., Fernandes, É.K.K., Golo, P.S., Camargo, M.G., Bittencourt, V.R.E.P., 2012. *Nomuraea rileyi* as biological control agents of *Rhipicephalus microplus* tick. *Parasitol. Res.* 111, 1743-1748.
- Phadke, C.H., Rao, L.M., 1978. Studies on the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Curr. Sci.* 47, 511-512.
- Phadke, C.H., Rao, V.G., Pawar, S.K., 1978. Natural outbreak of the muscardine fungus, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson on leaf eating caterpillar, *Spodoptera litura* Fab. in Maharashtra. *Curr. Sci.* 47, 476-478.

- Poletto, G., Benedetti, A.J., Barros, N.M., Vargas, L.R.B., Specht, A., 2010. *Aucula magnifica* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Noctuidae: Agaristinae): morphology of egg and last instar larvae. *Braz. J. Biol.* 70, 373-380.
- Prompiboon, P., Bhumiratana, A., Ruchirawat, S., Boucias, D.G., Wiwat, C., 2008. Isolation of ergosterol peroxide from *Nomuraea rileyi* infected larvae of tobacco cutworm. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2909-2917.
- Puttler, B., Ignoffo, C.M., Hostetter, D.L., 1976. Relative susceptibility of nine caterpillar species to the fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 27, 269-270.
- Qin, L., Liu, X., Li, J., Chen, H., Yao, Q., Yang, Z., Wang, L., Chen, K., 2009. Protein Profile of *Nomuraea rileyi* Spore Isolated from Infected Silkworm. *Curr. Microbiol.* 58, 578-585.
- Rao, V.G., Phadke, C.H., 1977. A muscardine disease of tobacco leaf eating caterpillar. *Curr. Sci.* 46, 648-649.
- Romero, M.G.Y., Salvatore, A.R., López, G., Willink, E., 2008. Presencia natural de hongos hyphomycetes en larvas invernantes de *Diatraea saccharalis* F. en caña de azúcar en Tucumán, Argentina. *Rev. Ind. Agríc. Tucumán* 85, 39-42.
- Saito, O., Oku, T., 1985. Population trends of the oriental corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée), in a corn field. *Bull. Tohoku Natl. Agric. Exp. Stn.*, 71: 43-57.
- Sandhu, S.S., Rajak, R.C., Agarwal, G.P., 1993. Microbial control agents of forest pests at Jabalpur. *Ann. For.* 1(2): 136-140
- Sandhu, S.S., Sharma, A.K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A. Jaglan, S., Sharma, A.K., Malhotra, S., 2012. Myco-Biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism, and regulation. *J. Pathog.* doi:10.1155/2012/126819
- Shekharappa, 2009. Biological control of earhead caterpillar, *Helicoverpa armigera* Hubner in sorghum. *J. Plant Prot. Sci.* 1, 69-70.
- Silva, L.d., Loch, L.C., 1993. Patogenicidade do Fungo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson após seis anos de armazenamento. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 28, 1005-1009.
- Smith, R.J., Grula, E.A., 1982. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 39, 15-22.
- Song, Z., Yin, Y., Jiang, S., Liu, J., Chen, H., Wang, Z., 2013. Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. *BMC Genomics* 14, 1-9.
- Sosa-Gómez, D.R., Boucias, D.G., Nation, J.L., 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 31-39.

- Sosa-Gómez, D.R., Delpin, K.E., Moscardi, F., Nozaki, M.d.H., 2003. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. *Neotropical Entomol.* 32, 287-291.
- Sosa-Gómez, D.R., Humber, R.A., Hodge, K.T., Binneck, E., Silva-Brandão, K.L., 2009. Variability of the mitochondrial SSU rDNA of *Nomuraea* species and other entomopathogenic fungi from Hypocreales. *Mycopathol.* 167, 145-154.
- Sosa-Gómez, D.R., López Lastra, C.C., Humber, R.A., 2010. An Overview of Arthropod-Associated Fungi from Argentina and Brazil. *Mycopathol.* 170, 61-76.
- Sosa-Gómez, D.R., Silva, J.J., 2002. Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados. Embrapa Soja, Londrina.
- Srisukchayakul, P., Wiwat, C., Pantuwatana, S., 2005. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. *Sci. Asia* 31, 273-276.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1988. Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 52, 356-359.
- Storer, N.P., Kubiszak, M.E., Ed King, J., Thompson, G.D., Santos, A.C., 2012. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 294-300.
- Sujii, E.R., Tigano, M.S., Sosa-Gomez, D.R., 2002. Simulação do impacto do fungo *Nomuraea rileyi* em populações da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 37, 1551-1558.
- Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A., Wiwat, C., 2010. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 228-235.
- Suwannakut, S., Boucias, D.G., Wiwat, C., 2005. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 90, 169-176.
- Svinningen, A.E., Jegathambigai, V., Mikunthan, G., 2010. *Nomuraea rileyi*: a plausible fungi selectively controlling lepidopteron, *Paraponyx stratiotata* L. damaging queen palm (*Livistona rotundifolia* L.). *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 75, 279-293.
- Tang, L.-C., Hou, R.F. 2001. Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm. *J. Appl. Entomol.* 125, 243-248.
- Thakre, M., Thakur, M., Malik, N., Ganger, S., 2011. Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rielyi* using agricultural products and agro wastes. *J. Biopestic.* 4, 176-179.

- Thorvilson, H.G., Pedigo, L.P., Lewis, L.C., 1985. Soybean leaf consumption by *Nomuraea rileyi* (Fungi: Deuteromycotina) - infected *Plathypena scabra* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Invertebr. Pathol. 46, 265-271.
- Tigano-Milani, M.S., Faria, M., Lecuona, R.E., Sartori, M.R., Arima, E.Y., Diaz, B.M., 1995. Análise de patogenicidade e germinação do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolado no Distrito Federal. An. Soc. Entomol. Bras. 24, 53-60.
- Torres, L., Cotes, A.M., 2005. Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad y la actividad biocontroladora de *Nomuraea rileyi* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Colomb. Entomol. 31, 133-138.
- Vargas, L.R.B., Rossato, M., Ribeiro, R.T.S., Barros, N.M., 2003. Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. Braz. Arch. Biol. Technol. 46, 13-18.
- Vargas, M.L., Sanchez, G.G., 1983. Natural control of some pests of the rice varieties IR-22 and CICA-6. Rev. Colomb. Entomol. 9, 50-54.
- Vega-Aquino, P., Sanchez-Peña, S., Blanco, C.A., 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. J. Invertebr. Pathol. 103, 145-149
- Vimala Devi, P.S., 1994. Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab) on *Ricinus communis*. J. Invertebr. Pathol. 63, 145-150.
- Vimala Devi, P.S., Prasad, Y.G., 1996. Compatibility of oils and antifeedants of plant origin with the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 68, 91-93.
- Vimala Devi, P.S., Prasad, Y.G., 2001. *Nomuraea rileyi* - A Potential Mycoinsecticide. In: Upadhyay, R.k., Mukerji, K.G., Chamola, B.P., Eds.), Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Vimala Devi, P.S., Prasad, Y.G., Chowdary, D.A., Rao, L.M., Balakrishnan, K., 2003. Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. Mycopathol. 156, 365-373.
- Wasti, S.S., Hartmann, G.C., 1978. Host-parasite interactions between larvae of the gypsy moth, *Limantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Limantridae) and the entomogenous fungus, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson (Moniliales: Moniliaceae) Appl. Entomol. Zool. 13, 23-28.

Wright, S.P., Ramos, M.E., Avery, P.B., Jaronski, S.T., Vandenberg, J.D., 2010. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. J. Invertebr. Pathol. 103, 186-199.

Ye, M.Z., Hang, G.Y., Fu, C.L., Bao, J.R., 1993. Insecticidal toxin produced by the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. Acta Agricola 19, 76-79.

4 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais do presente trabalho, pode-se concluir que:

A composição lipídica cuticular das quatro espécies de larvas de Lepidoptera avaliadas difere quali-quantitativamente. Hidrocarbonetos, principalmente alcanos, são os componentes predominantes em *A. gemmatalis*, *R. nu* e *M. sequax*, porém, nas duas primeiras foram encontrados respectivamente 15 e 36 compostos, e apenas seis em *M. sequax*;

Hidrocarbonetos são os principais componentes entre os lipídios cuticulares de *A. gemmatalis*, enquanto vitamina E foi o composto majoritário em *S. cosmioides* correspondendo a cerca de 70% da quantidade total de lipídios identificados;

A presença da vitamina E na cutícula de *S. cosmioides*, *R. nu* e *A. ipsilon* e sua ausência em *A. gemmatalis* indicam que estas espécies possuem vias metabólicas distintas;

A possível influência da vitamina E na susceptibilidade/resistência das espécies avaliadas à infecção por *N. rileyi* pode estar relacionada com a quantidade do composto presente na cutícula;

Em *M. sequax* o conteúdo de ácidos graxos foi superior às demais, respondendo por cerca de 20% dos lipídios cuticulares. Em *S. cosmioides*, o componente principal é a vitamina E;

As linhagens CH87551 e UB93150 de *N. rileyi* apresentaram diferenças de patogenicidade e virulência para as espécies avaliadas;

A CL₅₀ e a CL₉₅ (log-dose) para *A. gemmatalis* foram de 6,73 e 7,97 e 7,57 e 8,80, enquanto para *R. nu* foram de 8,26 e 9,16 e 9,30 e 10,20 com a utilização das linhagens CH87551 e UB93150, respectivamente, no oitavo dia;

A linhagem UB93150 foi capaz de infectar e causar mortalidade em *S. cosmioides*, embora inferior a 12%, enquanto *M. sequax* não foi susceptível a nenhuma das linhagens avaliadas;

A adesão de conídios de *N. rileyi* à superfície cuticular foi observada nas quatro espécies. Em *S. cosmioides* e *M. sequax*, conídios germinados foram visualizados sobre a superfície cuticular 24 horas após contato inicial com o patógeno e 48 e 72 horas após, somente conídios não germinados foram observados em larvas destas duas espécies;

A resistência de *S. cosmioides* e *M. sequax* ao fungo entomopatogênico *N. rileyi* não foi devida à falta de adesão dos conídios à superfície cuticular;

A susceptibilidade diferencial entre as espécies avaliadas ao entomofungo *N. rileyi* pode estar associada à variabilidade entre as linhagens do fungo e também às diferenças na composição lipídica cuticular das larvas;

Nas espécies avaliadas neste trabalho, a composição lipídica cuticular pode estar afetando o patógeno devido à presença de compostos que impedem a germinação, o desenvolvimento e a

penetração na cutícula, ou por deficiências nutricionais, não possibilitando ao patógeno a absorção de nutrientes que suportem seu estabelecimento inicial sobre a cutícula;

O uso de *N. rileyi* no controle de pragas em campo é incipiente se comparado a outros fungos, no entanto, seu potencial é indiscutível visto entre seus hospedeiros encontram-se muitas pragas-chaves de culturas de elevada importância econômica;

5 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Allen, G.E.; Greene, G.L.; Whitcomb, W.H. (1971). An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Florida. **Fla. Entomol.** 54, 189-191.
- Alves, S.B. (1998). **Fungos entomopatogênicos**. In: Alves, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. FEALQ Piracicaba, p. 289-381.
- Alves, S.B.; Lopes, R.B. (2008). **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. Piracicaba: FEALQ. 414 p.
- Andersen, S.O. (2011). Are structural proteins in insect cuticles dominated by intrinsically disordered regions? **Insect Biochem. and Mol. Biol.** 41(8): 620-627.
- Andersen, S.O., P. Hojrup, et al. (1995). Insect Cuticular Proteins. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 25(2): 153-176.
- Bavaresco, A.; Garcia, M.S.; Grützmacher, A.D.; Foresti, J.; Ringenberg, R. (2001). Efeito de fontes de carboidratos sobre o desempenho reprodutivo de *Spodoptera cosmioides* (Walk., 1858) (Lepidoptera: Noctuidae). **Rev. Bras. Agrocienc.**, 7(3): 177-180.
- Bavaresco, A.; Garcia, M.S.; Grützmacher, A.D.; Foresti, J.; Ringenberg, R. (2003). Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk., 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão. **Ciênc. Rural**, 33(6): 993-998.
- Biezanko, C.M.; Ruffinelli, A. ; Link, D. (1974). Plantas y otras sustancias alimenticias de las orugas de los lepidopteros uruguayos. **Rev. Cent. Cienc. Rurais**, 4(2): 107-148
- Boucias, D.G.; Pendland, J.C. (1991). **Attachment of mycopathogens to cuticle**. In: Cole, G.T.; Hoch, H.C. (Ed). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. Plenum Press, New York. P. 101-124.
- Boucias, D.G.; Pendland, J.C. (1982). Ultrastructural studies on the fungus, *Nomuraea rileyi*, infecting the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **J. Invertebr. Pathol.** 39(3): 338-345.
- Boucias, D.G.; Pendland, J.C. (1984). Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **J. Invertebr. Pathol.** 43(2): 288-292.
- Boucias, D.G.; Pendland, J.C. (1987). Detection of protease inhibitors in the hemolymph of resistant *Anticarsia gemmatalis* which are inhibitory to the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Experientia** 43, 336-339.
- Boucias, D.G.; Pendland, J.C.; Latgé, J.P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. **Appl. Environ. Microbiol.** 54, 1795-1805.

- Boucias, D.G.; Tigano, M.S.; Sosa-Gomez, D.R.; Glare, T.R.; Inglis, P.W. (2000). Genotypic Properties of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi*. **Biol. Control** 19, 124-138.
- Bravo, A.; Likitvivatanavong, S.; Gill, S.S.; Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 41, 423-431.
- Carruthers, R.I.; Sawyer, A.J.; Hural, K. (1991). **Use of fungal pathogens for biological control of insect pests**. In: Rice, B.J. (Ed.) **Sustainable agriculture research and education in the field: a proceedings**. National Academic Press, Washington 336-369
- Chiaravalle, W.R., 2006. *Rachiplusia nu* (Guenée). In: Bentancourt, C.M.; Scatoni, I.B. (Ed.) **Lepidopteros de importância econômica em Uruguay: reconhecimento, biologia y daños de las plagas agrícolas y forestales**. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp. 353-359.
- Clarkson, J.M.; Charnley, A.K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiol.** 4(5): 197-203.
- El-Sayed, G.N.; Ignoffo, C.M.; Leathers, T.D.; Gupta, S.C. (1993). Effects of cuticle and concentration on expression of hydrolitic enzymes by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Mycopathol.** 122: 149-152.
- 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 *Nomuraea rileyi*. **Mycopathol.** 113: 95-102.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silviera Neto, S.; Carvalho, L.P.L.; Batista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramini, J.D. (2002). **Entomologia Agrícola**. São Paulo, FEALQ.
- Gibbs, A. (1995). Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: Model mixtures and lipid interactions. **Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.** 112(4): 667-672.
- Golebiowski, M.; Malinski, E.; Nawrot, J.; Szafranek, J.; Stepnowski, P. (2007). Identification of the cuticular lipid composition of the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis*. **J. Invertebr. Pathol.** 147(2): 288-292.
- Golebiowski, M.; Malinski, E.; Nawrot, J.; Stepnowski, P. (2008a). Identification and characterization of surface lipid components of the dried-bean beetle *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **J. Stored Prod. Res.** 44(4): 386-388.
- Golebiowski, M.; Malinski, E.; Bogus, M.; Kumirska, J.; Stepnowski, P. (2008b). The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 38: 619-627.
- Gołębowski M.; Boguś M.I.; Paszkiewicz, M.; Stepnowski, P. (2011) Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. **Anal. Bioanal. Chem.** 399(9):3177-91. doi:10.1007/s00216-010-4439-4.

- Grego, C.R.; Vieira, S.R.; Lourenção, A.L. (2006). Spatial distribution of *Pseudaletia sequax* Franclemont in triticale under No-till management. **Sci. Agric.** 63(4): 321-327.
- Guo, L.; Blomquist, G.J. (1991). Identification, accumulation, and biosynthesis of the cuticular hydrocarbons of the southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 16(1), 19-30.
- Herzog, D.C.; Tood, J.W. (1980). **Sampling velvetbean caterpillar on soybean**. In: Kogan, M.; Herzog, D.C. (eds). **Sampling methods in soybean entomology**. New York, p.107-140
- Humber, R.A.; Hansen, K.S.; Wheeler, M.M. (2011). **Catalog of species. ARSef ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures**. Ithaca, pp. 517.
- Ibrahim, L.; Butt, T.M.; Beckett, A.; Clark, S.J. (1999). The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. **Mycol. Res.** 103, 901-907.
- Ignoffo, C.M. (1981). **The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide**. In: Burges, H.D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases: 1970-1980**. London: Academic, 1981. p. 513-538.
- Ignoffo, C.M.; Boucias, D.B. (1992). Relative activity of geographical isolates of *Nomuraea* bioassayed against the cabbage looper and velvetbean caterpillar. **J. Invertebr. Pathol.** 59, 215-217.
- Ignoffo, C.M.; Marston, N.L.; Hostetter, D.L.; Puttler, B.; Bell, J.V. (1976). Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. **J. Invertebr. Pathol.** 27(2): 191-198.
- Ignoffo, C.M.; Puttler, B.; Marston, N.L.; Hostetter, D.L.; Dickerson, W.A. (1975). Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria rileyi* associated with noctuid pests of soybeans. **J. Invertebr. Pathol.** 25, 135-137.
- Koidsumi, K. (1957). Antifungal action of cuticular lipids in insects. **J. Insect Physiol.** 1(1): 40-51.
- Kumar, V.; Singh, G.P.; Kumar, V.; Babu, A.M.; Datta, R.K. (1997). SEM study on the invasion of *Nomuraea rileyi* (Farlow) on silkworm, *Bombyx mori* Linn. causing green muscardine. **Mycopathol.** 138: 141-144.
- Lafontaine, J.D.; Schmidt, B.C. (2010). Annotated check list of the Noctuoidea (Insecta, Lepidoptera) of North America north of Mexico. **ZooKeys** 40: 1–239 doi: 10.3897/zookeys.40.414
- Lockey, K.H. (1985). Insect cuticular lipids. **Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.** 81(2): 263-273.
- Lockey, K.H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.** 89(4): 595-645.

- Lord, J.C., Howard, R.W. (2004). A Proposed Role for the Cuticular Fatty Amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in Preventing Adhesion of Entomopathogenic Fungi with Dry-conidia. **Mycopathol.** 158: 211-217.
- Mohamed, A.K.A.; Nelson, F.R.S. (1984). Toxic effects of *Nomuraea rileyi* extract on *Heliothis* spp. **J. Agric. Entomol.** 1: 349-353.
- Morrow, B.J.; Boucias, D.G.; Heath, M.A. (1988). Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*, after serial in vitro passage. **J. Econ. Entomol.** 82(2), 404-407.
- Moscardi, F. 1998. **Utilização de vírus entomopatogênicos em campo**, In: Alves, S.B. (ed). **Controle Microbiano de insetos**. Piracicaba, Fealq, p. 509-539.
- Moscardi, F.; Kastelic, J.G.; Sosa-Gómez, D.R. (1992). Susceptibilidade de três espécies de lepidópteros associados à soja à três isolados do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. **An. Soc. Entomol. Bras.** 21(2): 93-100.
- Moussian, B. (2010). Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 40(5): 363-375.
- Nelson, D. R. and G. J. Blomquist (1995). **Insect waxes**. In: Hamilton. R.J. (Ed.) **Waxes: chemistry, molecular biology and functions**. Dundee, Scotland, The Oily Press Lipid Library. **6**: 349.
- Noda, T.; Ono, M.; Iimure, K.; Araki, T. (2010a). Characterization of a germination-accelerating factor from the silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 74(6): 1226-1230.
- Noda, T.; Ono, M.; Iimure, K.; Araki, T. (2010b). Isolation of a bioactive substance from the silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) that accelerates the germination of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 74(3): 563-568.
- Noda, T.; Satoh, T.; Iimure, K.; Ono, M.; Araki, T. (2011). The effect of amino acids on the C14-sphingosine-triggered germination of *Nomuraea rileyi*, and surface amino acids on *Spodoptera litura* Fabricius. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 75(4): 771-773.
- Nunes, A.R.F.; Martins, J.N.; Furlaneto, M.C.; Barros, N.M. (2010). Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis*. **Ciência Rural**: 1-7.
- Onofre, S.B.; Gonzales, R.R.; Messias, C.L.; Azevedo, J.L.; Barros, N.M. (2002). LC₅₀ of the peptide produced by the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson against third instar larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae). **Braz. Arch. Biol. Technol.** 45, 269-275.

- Poole, R.W. (1989). **Noctuidae**. Pp. 501-1013. In: J. B. Heppner (Ed). **Lepidopterorum Catalogus**. New York, Brill, v. 2, 1314p.
- Promptiboon, P.; Bhumiratana, A.; Ruchirawat, S.; Boucias, D.G.; Wiwat, C. (2008). Isolation of ergosterol peroxide from *Nomuraea rileyi* infected larvae of tobacco cutworm. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24, 2909-2917.
- Puttler, B.; Ignoffo, C.M.; Hostetter, D.L. (1976). Relative susceptibility of nine caterpillar species to the fungus *Nomuraea rileyi*. **J. Invertebr. Pathol.** 27, 269-270.
- Silva, A.G.D'A.; Gonçalves. C.R.; Galvão D.M.; Gonçalves, A.J.L.; Gomes J.; Silva, M.M.; Simoni, L. (1968). **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores**. Parte II – 1º Tomo. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 622p.
- Smith, R.J.; Pekrul, S.; Grula, E.A. (1981). Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). **J. Invertebr. Pathol.** 38, 335-344.
- Sosa-Gómez, D.R. (2004). Intraspecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genet. Mol. Biol.** 27(3): 378-384.
- Sosa-Gómez, D.R.; Boucias, D.G.; Nation, J.L. (1997). Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* Cuticle and Fungistatic Effect of Cuticular Lipids and Aldehydes. **J. Invertebr. Pathol.** 69, 31-39.
- Sosa-Gómez, D.R.; Humber, R.A.; Hodge, K.T.; Binneck, E.; Silva-Brandão, K.L. (2009). Variability of the Mitochondrial SSU rDNA of *Nomuraea* species and other entomopathogenic fungi from Hypocreales. **Mycopathol.** 167: 145-154.
- Sosa-Gómez, D.R.; Silva, J.J. (2002). **Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados**. Embrapa Soja, Londrina.
- Specht, A.; Corseuil, E. (1996). Lista documentada dos noctuídeos (Lepidoptera: Noctuidae) ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. **Biocienc.** 4(2): 131-170.
- Specht, A.; Corseuil, E. (1998). Novas ocorrências de noctuídeos (Lepidoptera: Noctuidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências** 6(1): 123-129.
- Specht, A.; Corseuil, E. (2001). Ocorrências de noctuídeos (Lepidoptera: Noctuidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Nota Suplementar I. **Biociências** 9(2): 97-103.
- Specht, A.; Corseuil, E. (2002a). Avaliação populacional de lagartas e inimigos naturais em azevém, com rede de varredura. **Pesqui Agropecu Bras** 37(1): 1-6.

- Specht, A.; Corseuil, E. (2002b). Ocorrencias de noctuídeos (Lepidoptera: Noctuidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Nota Suplementar II. **Biocienc.** 10(1): 169-174.
- Srisukchayakul, P.; Wiwat, C.; Pantuwatana, S. (2005). Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. **Sci. Asia** 31: 273-276.
- Suwannakut, S.; Boucias, D.G.; Wiwat, C. (2005). Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. **J. Invertebr. Pathol.** 90(3): 169-176.
- Thakre, M.; Thakur, M.; Malik, N.; Ganger, S. (2011). Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. **J. Biopestic.** 4, 176-179.
- Thorvilson, H.G.; Lewis, L.C.; Pedigo, L.P. (1985). Histopathology of *Nomuraea rileyi* in *Plathypena scabra* larvae. **J. Invertebr. Pathol.** 45, 34-40.
- Torres, L.; Cotes, A.M. (2005). Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad y la actividad biocontroladora de *Nomuraea rileyi* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Rev. Colomb. Entomol.** 31, 133-138.
- Vargas, L.R.B.; Rossato, M.; Ribeiro, R.T.S.; Barros, N.M. (2003). Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 46: 13-18.
- Vega-Aquino, P.; Sanchez-Peña, S.; Blanco, C.A. (2010). Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. **J. Invertebr. Pathol.** 103, 145-149
- Vimala Devi, P.S.; Prasad, Y.G.; Chowdary, D.A.; Rao, L.M.; Balakrishnan, K. (2003). Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Mycopathol.** 156, 365-373.
- Wraight, S.P.; Ramos, M.E.; Avery, P.B.; Jaronski, S.T.; Vandenberg, J.D. (2010). Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. **J. Invertebr. Pathol.** 103, 186-199.
- Xiong, Q.; Xie, Y.; Zhu, Y.; Xue, J.; Li, J.; Fan, R. (2013). Morphological and ultrastructural characterization of *Carposina sasakii* larvae (Lepidoptera: Carposinidae) infected by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae). **Micron** 44, 303-311.
- Yanagawa, A.; Yokohari, F.; Shimizu, S. (2008). Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. **J. Invertebr. Pathol.** 97, 165-170.
- Zenker, M.M.; Specht, A.; Corseuil, E. (2007). Estagios imaturos de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae). **Rev. Bras. Zool.** 24(1): 99-107.