

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA KATISKI DA COSTA STUART

BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FUNGOS NO  
CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae)

CURITIBA

2021

ANDRESSA KATISKI DA COSTA STUART

BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FUNGOS NO  
CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae)

Tese de Doutorado apresentado ao programa de Microbiologia, Parasitologia e Patologia, do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Stuart, Andressa Katiski da Costa  
Bioprospeção e avaliação da interação de fungos no controle de  
*Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). / Andressa Katiski da  
Costa Stuart. – Curitiba, 2021.  
246 p.: il.

Orientadora: Ida Chapaval Pimentel.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e  
Patologia.

1. Pragas - Controle Biológico. 2. Lepidóptero. 3. Mariposa. 4. Fungos.  
5. Morango - Brasil. I. Título. II. Pimentel, Ida Chapaval. III. Universidade  
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 632.78



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,  
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANDRESSA KATISKI DA COSTA STUART** intitulada: **BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FUNGOS NO CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae)**, sob orientação da Profa. Dra. IDA CHAPAVAL PIMENTEL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Julho de 2021.

Assinatura Eletrônica  
03/08/2021 15:15:46.0  
IDA CHAPAVAL PIMENTEL  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
02/08/2021 10:47:38.0  
ILARA GABRIELA FRASSON BUDZINSKI  
Avaliador Externo ( ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE  
QUEIROZ - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica  
04/08/2021 07:37:03.0  
EDVALDO ANTONIO RIBEIRO ROSA  
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO  
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
31/07/2021 00:26:59.0  
PAULO HENRIQUE GORGATTI ZARBIN  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
03/08/2021 14:44:01.0  
JULIANA FEIJÓ DE SOUZA DANIEL  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO  
PARANÁ)

Dedico esta tese à minha mãe Madalena, que é meu maior exemplo de força e resiliência.

Também dedico à família mais linda desse mundo, que são meu alicerce: meu esposo Rodrigo, que sempre esteve ao meu lado, e nossos filhos caninos Baunilha, Mingau e Maizena, que mesmo sem saber foram fundamentais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

A minha orientadora, Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel pelo acompanhamento, orientação e amizade. Por confiar no meu potencial e me dar autonomia durante nosso período juntas.

Ao professor Dr. Carlos A. Labate, pela acolhida em seu laboratório e por disponibilizar toda sua estrutura para a realização do nosso trabalho.

A Dra. Thais R. Cataldi, por me acompanhar, orientar e auxiliar durante todas as análises de metabolômica e pela amizade que construímos.

A Profa. Dra. Maria Aparecida Zawadneak, pela colaboração e parceria junto ao projeto do morango.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, Madalena e minhas tias Izabel e Maria, por todo o apoio, pelas palavras de incentivo e por estarem ao meu lado ao longo de toda a minha vida, em cada desafio.

Ao meu esposo Rodrigo, que além de me incentivar nessa jornada, abdicou de muitas e muitas horas corrigindo artigos e documentos, dando sugestões e contribuindo para que esta tese ficasse como está hoje.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, que sempre estiveram ao meu lado nesta caminhada, ajudando nos momentos de dúvidas e festejando nos momentos de lazer.

A todos os professores que contribuíram para o meu desenvolvimento durante meu processo de formação acadêmica.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade e a CAPES pela bolsa auxílio.

Por fim, agradeço a mim mesma, por não desistir frente às adversidades, por ter perseverado e ter chegado até aqui.

“Assim como os pés são a base do corpo,  
o conhecimento é a base do ser.”

- Plá

## RESUMO

O morango é amplamente consumido no mundo todo e constitui a principal fonte de renda de diversas famílias brasileiras. Um dos principais desafios desta cultura é a incidência de pragas, sendo a mariposa *Duponchelia fovealis* a que vem causando maiores danos atualmente. Por ser uma praga exótica no Brasil, ainda não existe controle químico ou biológico registrado para essa praga, o que acarreta o uso indiscriminado de agrotóxicos nesta cultura. Devido aos danos causados por estes produtos ao meio ambiente e a saúde humana, implementa-se o controle biológico como principal alternativa ao uso de produtos químicos, pois este possui grande efetividade sem causar danos. Estudos avançados dentro do controle biológico têm demonstrado que a associação de dois ou mais organismos é capaz de melhorar o controle de pragas e doenças agrícolas, além de trazer benefícios à planta e ao meio ambiente. Entretanto pesquisas avaliando a interação entre fungos entomopatogênicos, atuando como consórcio fúngico, ainda são uma lacuna neste campo de estudos, e pouco se sabe sobre a interação molecular de tais agentes de biocontrole e sua praga alvo. A metabolômica é uma das melhores alternativas para estudar estas interações, uma vez que sua abordagem é a que mais reflete as alterações fenotípicas causadas em resposta a alterações genéticas e ambientais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos das espécies *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* e *Purpureocillium lilacinum* para formação de um consórcio fúngico capaz de aumentar a mortalidade de *D. fovealis*. Além disso, foram avaliadas as moléculas envolvidas na relação entre os fungos constituintes do consórcio, entre consórcio e lagartas mortas e também nas lagartas que sobreviveram à aplicação dos fungos, buscando entender melhor a interação molecular entomopatogeno-lagarta. Foi possível a obtenção de sete consórcios que demonstraram aumento no controle de lagartas de *D. fovealis*, quando comparados com as linhagens aplicadas separadamente, sendo o consórcio mais efetivo formado por duas linhagens de *B. bassiana*. Este consórcio foi selecionado para avaliação de metabolômica através de LC-MS/MS e GC-MS e foi possível a detecção de metabólitos que auxiliam a ação conjunta dos isolados, tanto na sua coexistência durante o processo de infecção como aqueles usados para suprimir o sistema imune da lagarta. Neste caso, foram observados três principais modos de ação: metabólitos antioxidantes, anti-inflamatórios e com ação inseticida. Foram também identificados marcadores de resposta de defesa do inseto, os quais podem estar diretamente envolvidos na sobrevivência de algumas lagartas frente ao ataque dos fungos.

Palavras-chave: Lagarta-da-coroa. Consórcio fúngico. Fungos entomopatogênicos. Metabolômica.



## ABSTRACT

Strawberries are widely consumed worldwide, and its farming is the main source of income for several Brazilian families. One of the main challenges of this culture is the incidence of pests and *Duponchelia fovealis* is nowadays, the most harmful. As it is an exotic pest, there is still no chemical or biological control registered for this pest in Brazil, which leads to indiscriminate use of pesticides in this crop. Due to the toxicity of these products, biological control is the main alternative with great effectiveness without causing environmental or health damage. Advanced studies have shown that the association of two or more microorganisms promote a better control of agricultural diseases, in addition to the plant benefits and environment. However, there are no previous studies evaluating the interaction between entomopathogenic fungi acting as a fungal consortium against insect pests. Besides little is known about the molecular interaction of such biocontrol agents and their target pest. Metabolomics is the main alternatives to evaluate those interactions, since its approach is the one that most reflects the phenotypic transitions caused in response to genetic and environmental changes. Thus, we seek evaluate the interaction of different entomopathogenic fungi of *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* and *Purpureocillium lilacinum* species to form a fungal consortium capable of increase *D. fovealis* mortality. In addition, we evaluate the molecules of consortium-infected *D. fovealis*, in order to a better understand of its molecular interaction. Seven consortia were able to increase *D. fovealis* biocontrol, when compared to the strains applied separately. A two-fungi consortium formed by two strains of *B. bassiana* was the most effective. This consortium was selected for metabolomics approach through GC-MS and LC-MS/MS. The metabolites detected seems to be linked to fungal possible coexistence in the infection process, as well as some of them seems to be used by the fungi to escape *D. fovealis* immune system of. In this case, three mechanisms were identified as by the consortium metabolites: antioxidative, anti-inflammatory and insecticidal. Other metabolites seem to be possible markers of the moth defense mechanism, directly involved in *D. fovealis* larvae survival of the consortium attack.

Key-words: European pepper moth. *Fungal consortium*. Entomopathogenic fungi. Metabolomics

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	21
<b>3</b>	<b>CAPITULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	28
<b>3.1</b>	<b>ARTIGO I – O ESTADO DA ARTE NO MANEJO DE <i>Duponchelia fovealis</i> EM MORANGUEIRO NO RASIL E NO MUNDO</b> .....	29
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b> .....	35
2.1	MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS DO MORANGUEIRO.....	35
2.2	INCIDÊNCIA DE <i>Duponchelia fovealis</i> NO MORANGUEIRO.....	37
2.3	MANEJO DE <i>Duponchelia fovealis</i> EM MORANGUEIRO.....	38
2.3.1	Controle Químico.....	38
2.3.2	Inimigos Naturais.....	40
2.3.3	Controle Microbiológico.....	43
2.3.4	Extratos vegetais e Óleos Essenciais.....	45
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
<b>4</b>	<b>CAPITULO II – FORMAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA CONTROLE DE <i>Duponchelia fovealis</i></b> .....	57
<b>4.1</b>	<b>ARTIGO II – INCREASED MORTALITY OF THE EUROPEAN PEPPER MOTH <i>Duponchelia fovealis</i> (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) USING ENTOMOPATHOGENIC FUNGAL CONSORTIA</b> .....	58
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	61
<b>2</b>	<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	63
2.1	FUNGAL INOCULA.....	63
2.2	FUNGAL COMPATIBILITY.....	63

2.3	INDIVIDUAL ENZYME ASSAY.....	64
2.3.1	Preparation of Chitinase medium.....	64
2.3.2	Preparation of Cellulase medium.....	65
2.3.3	Preparation of Protease medium.....	65
2.3.4	Preparation of Lipase medium.....	65
2.4	INSECT CULTURES.....	65
2.5	LABORATORY BIOASSAY WITH <i>Duponchelia fovealis</i> .....	66
2.6	ENZYME ASSAY OF THE CONSORTIA.....	67
<b>3</b>	<b>RESULTS</b> .....	<b>68</b>
3.1	FUNGAL COMPATIBILITY.....	68
3.2	ENZYME ASSAYS OF INDIVIDUAL FUNGI.....	68
3.3	LABORATORY BIOASSAY WITH <i>Duponchelia fovealis</i> .....	69
3.4	ENZYME ACTIVITIES IN THE CONSORTIA.....	72
<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>75</b>
	<b>REFERENCES</b> .....	<b>79</b>
	<b>ANEXO 1</b> .....	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>CAPITULO III – INTERAÇÃO METABÓLICA ENTRE LINHAGENS DE <i>Beauveria bassiana</i> NA FORMAÇÃO DE UM CONSÓRCIO E SUA AÇÃO CONTRA O SISTEMA IMUNE DE <i>Duponchelia fovealis</i></b> .....	<b>86</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>89</b>
<b>5.1</b>	<b>ARTIGO III – CONSÓRCIO DE DUAS LINHAGENS DE <i>Beauveria bassiana</i> AUMENTA SUA VIRULÊNCIA, CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA AO ESTRESSE: UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA</b> .....	<b>90</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>92</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>95</b>
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	95
2.2	EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS.....	95
2.3	ANÁLISE DE METABOLÔMICA NÃO DIRECIONADA.....	96
2.3.1	Identificação de metabólitos por GC-MS.....	96
2.3.2	Identificação de metabólitos por LC-MS/MS.....	97

<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	100
3.1	IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR GC-MS.....	100
3.2	IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR LC-MS/MS.....	103
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	114
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	122
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	124
	<b>APÊNDICE 1</b> .....	135
<b>5.2</b>	<b>ARTIGO IV – METABOLÔMICA DA INTERAÇÃO ENTRE O UM CONSÓRCIO FÚNGICO E <i>Duponchelia fovealis</i>: MECANISMOS DE ATAQUE E SOBREVIVÊNCIA</b> .....	138
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	140
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	142
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	142
2.1.1	Criação de <i>Duponchelia fovealis</i> .....	142
2.2	FORMAÇÃO DO CONSÓRCIO FÚNGICO.....	143
2.3	BIOENSAIO DE CONTATO DIRETO.....	143
2.4	EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS.....	144
2.5	ANÁLISE DE METABOLÔMICA NÃO DIRECIONADA.....	145
2.5.1	Identificação de metabólitos por GC-MS.....	145
2.5.2	Identificação d metabólitos por LC-MS/MS.....	146
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	149
3.1	IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR GC-MS.....	149
3.1.1	Lagartas mortas.....	149
3.1.2	Lagartas sobreviventes.....	151
3.2	LC-MS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	154
3.2.1	Lagartas mortas.....	154
3.2.2	Lagartas sobreviventes.....	157
3.3	FRAGMENTAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS.....	158
3.3.1	Lagartas mortas.....	159
3.3.2	Lagartas sobreviventes.....	168
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	178
4.1	LAGARTAS MORTAS.....	178
4.2	LAGARTAS SOBREVIVENTES.....	184

<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>191</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>192</b>
	<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>203</b>
	<b>APÊNDICE 2.....</b>	<b>207</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>211</b>
6.1	CONCLUSÃO GERAL.....	212
	<b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>216</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria × ananassa* Duch.) é um dos frutos de pequeno porte com maior expressão econômica no Brasil (ANTUNES e JUNIOR, 2007; FACHINELLO et al., 2011), além de ser uma das culturas mais importantes ao redor do mundo dada sua relevância econômica e social, e por possuir papel fundamental na geração de empregos e renda para diversas famílias brasileiras (CARVALHO, 2011; VANDENDRIESSCHE et al., 2012; MADAIL, 2016; PARANÁ - SEAB, 2021). Nas últimas décadas, o consumo e comércio deste fruto vem aumentando consideravelmente na América Latina e também no Brasil, sendo o estado do Paraná o segundo maior produtor com Valor Bruto de Produção (VBP) de mais de R\$ 205 milhões em 2019, correspondente a 12,5% do valor gerado pela fruticultura no país (ANTUNES, BONOW E JUNIOR, 2020; PARANÁ - SEAB, 2019).

Um dos maiores desafios do morangueiro é a incidência de pragas (ZAWADNEAK et al., 2018; SOUZA e ZAWADNEAK, 2018; BENATTO et al., 2021) e, atualmente, a mariposa *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) é uma das mais importantes pragas que acomete esta cultura. No Brasil, é uma praga exótica e seu primeiro registro no morangueiro ocorreu em 2010, no estado do Paraná (ZAWADNEAK et al., 2011; 2016). As lagartas dessa espécie atacam diversas estruturas da planta, comprometendo a circulação de nutrientes e favorecendo a ação de fitopatógenos, além de causar danos nas folhas o que prejudica a fotossíntese e a qualidade dos morangos, deixando as plantas sensibilizadas, acarretando redução em sua produtividade e podendo levar à morte precoce da muda (EFIL, ÖZGÜR e EFIL, 2014; ZAWADNEAK, VIDAL e SANTOS, 2015; ZAWADNEAK et al., 2016, 2018). Esta praga possui alto potencial danoso por sua presença ao longo de todo o ciclo da cultura e seu controle é dificultado devido ao comportamento das lagartas, que permanecem na parte basal da planta (BRAMBILA e STOCKS, 2010; ZAWADNEAK et al., 2018).

A dificuldade em proteger a cultura contra esta e outras pragas leva ao uso em larga escala e, muitas vezes, indiscriminado, de inseticidas e a aplicação destes defensivos agrícolas muitas vezes ocorre de forma “preventiva”, ou seja, sem sequer observar a presença de pragas na cultura (OSHITA e JARDIM, 2012; VANDENDRIESSCHE et al., 2012). Esta prática gera problemas principalmente

devido à potente ação poluidora destes agroquímicos, bem como a potencial indução de resistência em insetos praga (VAN LENTEREN, 2012). Além disso, devido à ação de amplo espectro de alguns inseticidas, estes agem não apenas contra insetos prejudiciais, mas também contra insetos benéficos que atuam como inimigos naturais, promovendo o equilíbrio populacional de algumas espécies (VAN LENTEREN, 2012).

Outro fator preocupante decorrente da aplicação de inseticidas é o alto número de intoxicações em humanos e animais domésticos e de pasto. O uso inadequado de defensivos agrícolas pode acarretar o aparecimento de sintomas adversos e, em casos mais graves, levar a morte e pode ocorrer tanto na população em geral, por consumir produtos contaminados, como em trabalhadores rurais, sendo que a maioria dos óbitos por intoxicação com inseticidas são de trabalhadores que entram em contato constante com estes químicos sem os equipamentos de proteção, seja por falta de capacitação ou simplesmente, por negligência (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A aplicação indiscriminada de defensivos agrícolas, deixa resíduos nos frutos que, na sua maioria, são consumidos *in natura*, o que faz do morango um dos produtos agrícolas com maior residual de agroquímicos no país de acordo com os últimos relatórios expedidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL - ANVISA, 2016; BRASIL - MAPA, 2019).

No Brasil inexistem inseticidas registrados para emprego no controle de *D. fovealis* (BRASIL - AGROFIT, 2021) justificando a busca por estratégias que implementem o Manejo Integrado de Pragas (MIP). O MIP é formado por diversas estratégias de controle, sendo o controle biológico de pragas (CBP) uma das alternativas mais promissoras. CBP é definido como a utilização de um organismo para reduzir a densidade populacional de outro organismo, e demonstra grande eficácia no controle de pragas de diversas culturas, além de não apresentar toxicidade ao meio ambiente (EILENBERG E LOMER, 2001; VAN LENTEREN, 2012; ALVIN, MILLER e NEILAN, 2014; PARRA E JUNIOR, 2019). Além disso, é considerado uma solução efetiva e permanente, capaz de reduzir os danos causados por pragas exóticas, bem como reduzir a aplicação de inseticidas (MYERS e CORY, 2017). Neste método de controle são empregados organismos predadores, parasitoides, extratos vegetais,

feromônios e microrganismos, como bactérias, vírus e fungos e, dentre os fungos utilizados, destacam-se os fungos entomopatogênicos conhecidos por serem agentes naturais de controle biológico de inúmeras pragas (HAJEK e DELALIBERA JR, 2010). Os fungos entomopatogênicos, são capazes de causar infecções sobre as pragas tanto de modo direto, quando o entomopatógeno entra em contato direto com a cutícula da praga e de modo indireto, quando o inseto se contamina ao alimentar-se de plantas contaminadas, como folhas ou frutos. Independentemente do modo de infecção, após o contato com o fungo, há penetração dos conídios na cavidade corporal, o fungo se desenvolve e coloniza internamente o corpo do inseto causando sua morte (PELL, HANNAM e STEINKRAUSS, 2010). Os mecanismos biológicos envolvidos na virulência dos fungos entomopatogênicos abrangem diversas e complexas etapas que vão desde o reconhecimento e adesão a cutícula do inseto, à produção de diversas moléculas, incluindo enzimas hidrolíticas como lipases, celulasas, proteases e quitinases (VALADARES-INGLIS, LOPES, FARIA, 2020; metabólitos primários e secundários que irão facilitar a infecção, como toxinas, pigmentos e supressores imunológicos; além do aumento na taxa de germinação e formação de estruturas especializadas de infecção, como o apressório e os blastósporos (KHACHATOURIANS e QAZI, 2006; ORTIZ-URQUIZA e KEYHANI, 2013; QU e WANG, 2018). Exemplos de toxinas produzidas por fungos dessa classe são as beauvericinas e a bassianolida, que auxiliam na mortalidade do inseto (GIBSON et al., 2014). Diversos estudos vêm demonstrando a forma de atuação destes fungos no ataque ao seu inseto hospedeiro, bem como seus métodos de evasão do sistema imune e, em sua grande maioria são estudos de genômica, transcriptômica e proteômica (HARITH-FADZILAH, GHANI e HASSAN, 2020). Entretanto, a metabolômica, neste caso, ainda está em expansão, carecendo de estudos que abordem os metabólitos envolvidos no processo de interação inseto-patógeno (QUESADA-MORAGA, CARRASCO-DÍAZ e SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006; KELLER, 2019).

Atualmente, uma das principais alternativas para o estudo destas moléculas é a metabolômica. Este é um campo de estudo, composto por várias técnicas analíticas utilizadas para avaliar o conjunto de metabólitos produzidos ou modificados por um organismo, os quais participam de diversas reações químicas dentro da célula, e fazem parte de um complexo sistema regulatório



que promove constantes modificações nestas moléculas (VILAS-BÔAS e GOMBERT, 2006; FRAGA-CORRAL et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Por esta e outras razões, é uma excelente alternativa para avaliar o impacto de diferentes variáveis causado à determinados organismos. Na agricultura, esta técnica pode ser de extrema importância no entendimento da relação entre microrganismos patogênicos e insetos praga (XIAO et al., 2012; ORTIZ-URQUIZA e KEYHANI, 2016; HE et al., 2018; DING et al., 2020). Desta forma, a identificação dos metabólitos produzidos pelos fungos entomopatogênicos e pelos insetos durante sua colonização é de extrema importância, para que haja um melhor entendimento da interação entre patógeno/hospedeiro durante o biocontrole, bem como o conhecimento das moléculas de “ataque” e “defesa” produzidas nesta interação.

Estudos recentes têm demonstrado sucesso na utilização de consórcios microbianos no controle de pragas, associando dois ou mais organismos e obtendo um grande aumento no controle biológico observado, bem como outros benefícios, como melhora no desenvolvimento e aumento na produtividade de plantas, por exemplo (SANTHANAM et al., 2015; SHARMA et al., 2018; SANTHANAM et al., 2019). Alguns destes estudos também demonstram que, quando em consórcio, estes microrganismos passam a produzir metabólitos diferentes do que produziam separadamente, e que estes metabólitos “novos” podem estar envolvidos no aumento do biocontrole (FUENTES et al., 2016; SHARMA et al., 2018). Não há estudos prévios que demonstrem o uso de fungos entomopatogênicos como consórcio microbiano no controle de pragas agrícolas, sendo este trabalho, inédito neste quesito.

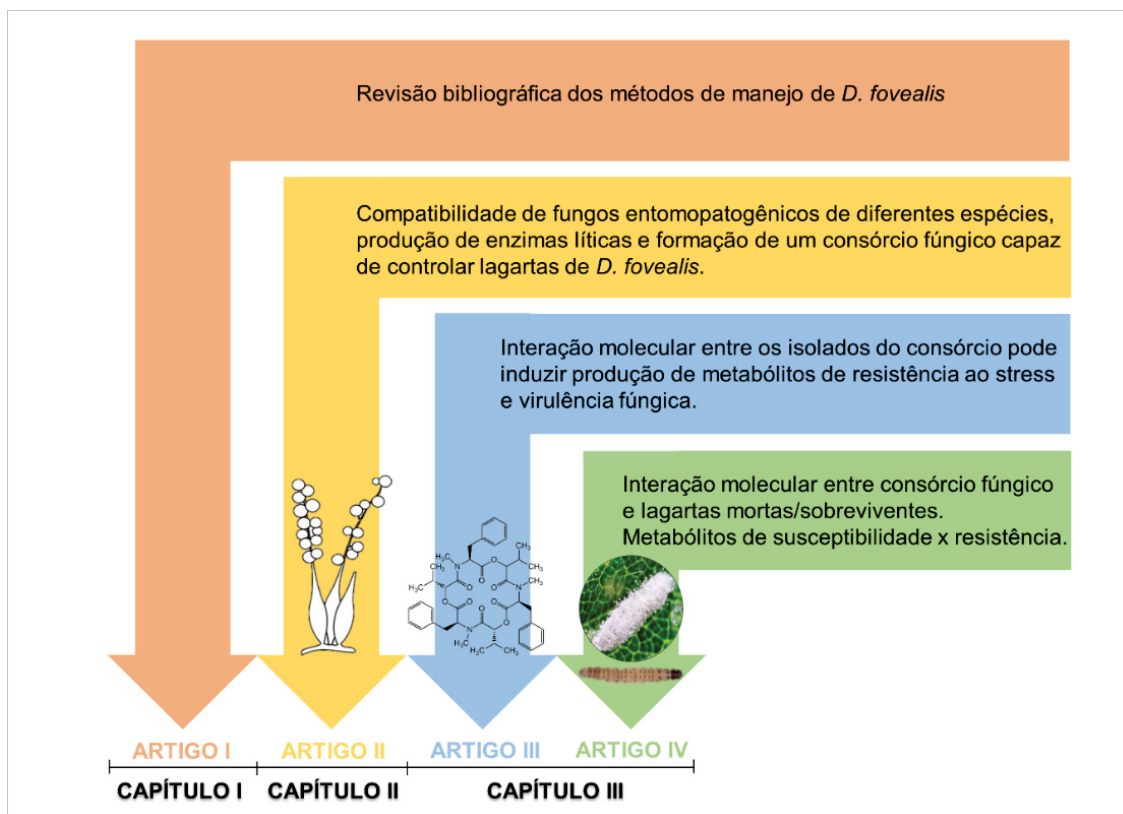
O reino Fungi é amplamente conhecido por englobar milhares de organismos com capacidade única de produzir metabólitos bioativos. Estudos que envolvem as vias metabólicas fúngicas e os produtos do seu metabolismo são anteriores ao século XIX e vêm, até hoje, ganhando cada vez mais espaço na ciência devido ao seu imenso potencial. Exemplos muito conhecidos de metabólitos de fungos que tiveram grande impacto na sociedade foram o antibiótico Penicilina e o antitumoral Taxol, dentre os outros metabólitos também descobertos encontram-se moléculas com ação citotóxica, mutagênica, carcinogênica, teratogênica, imunossupressores, inibidores de crescimento de bactérias, fungos, protozoários, parasitas, vírus, antitumorais e inseticidas

(KELLER, et al., 2005; KLLER, 2019). Desta forma, os fungos são tidos como biofábricas, capazes de produzir os mais variados compostos, e assim, controlar diversos organismos.

Os fungos entomopatogênicos são uma classe mundialmente conhecida e utilizada no controle de pragas, devido à sua grande efetividade o que eleva o interesse pelo desenvolvimento de produtos formulados que tem seus conídios como base, os biopesticidas. Além de sua efetividade no biocontrole, estes produtos biológicos, quando utilizados no MIP, reduzem a aplicação de agroquímicos, consequentemente os danos ambientais e à saúde do trabalhador e do consumidor (GUPTA e DIKSHIT, 2010). Entretanto, apesar de promissor, não há registros de bioinseticidas formulados a partir de fungos para controle de insetos na cultura do morangueiro no Brasil (BRASIL - AGROFIT 2020).

Sendo assim, o presente trabalho buscou selecionar fungos capazes de controlar *D. fovealis* para a criação de um consórcio fúngico, visando atingir maiores níveis de mortalidade da praga. As linhagens que apresentaram melhores resultados quanto a sua compatibilidade e atividade inseticida, foram avaliados quanto a produção de metabolitos através de cromatografia líquida (LC) e gasosa (GC) acopladas à espectrômetria de massas (MS) (FIGURA 1). Sendo este, o primeiro trabalho que se tem conhecimento sobre a metabolômica da interação entre fungos entomopatogênicos e a praga *D. fovealis*.

FIGURA 1 – DESCRIÇÃO DOS ARTIGOS APRESENTADOS NOS PRÓXIMOS CAPÍTULOS.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: Artigo 1: Revisão de literatura que aborda os métodos de manejo empregados para controle de *D. fovealis* ao redor do mundo, até o presente momento.

Artigo 2: Aborda a formação de diferentes consórcios fúngicos para avaliação do potencial inseticida, bem como seu aumento na mortalidade de *D. fovealis*.

Artigo III: Aborda a interação metabólica, avaliada através de GC-MS e LC-MS/MS, entre dois fungos da mesma espécie, formando um consórcio, os metabólitos provenientes desta interação e sua possível atuação contra *D. fovealis*.

Artigo IV: Apresenta a interação molecular entre consórcio fúngico e lagartas de *D. fovealis*, através da abordagem de metabolômica (GC-MS e LC-MS/MS), descrevendo metabólitos de ataque e de defesa durante a infecção fúngica.

## 2 OBJETIVOS

Bioprospecção de fungos entomopatogênicos para formação de um consórcio fúngico para o controle de *Duponchelia fovealis*, bem como avaliar a interação metabólica entre fungos e lagartas, através da caracterização dos metabólitos envolvidos no processo de biocontrole.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a compatibilidade de linhagens de fungos entomopatogênicos das espécies *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* e *Purpureocillium lilacinum*, para a formação de um consórcio fúngico;
- Avaliar a ação inseticida e interação dos diferentes consórcios no controle de *Duponchelia fovealis*;
- Avaliar através de LC-MS/MS e GC-MS os metabólitos envolvidos na interação entre as linhagens componentes do consórcio fúngico que apresentou maior controle de *Duponchelia fovealis*,
- Avaliar através de LC-MS/MS e GC-MS os metabólitos envolvidos na interação entre consórcio/lagartas mortas;
- Avaliar através de LC-MS/MS e GC-MS os metabólitos de *Duponchelia fovealis* sobreviventes ao controle biológico utilizado.

## REFERÊNCIAS

ALVIN A.; MILLER K. I.; NEILAN B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, Sydney, v. 169, p. 483-495, 2014.

AMATUZZI, R. F.; POITEVIN, C. G.; POLTRONIERI, A. S.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to Soil-Borne Entomopathogenic Fungi. **Insects**, Curitiba, v.9, n. 2, p. 70, 2018.

ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; JUNIOR, C. R. Morango – Crescimento constante em área de produção. **Anuário HF 2020 - Campo e Negócios**, p. 88-92, 2020.

ANTUNES, L. E. C.; JUNIOR, C. R. Fragoli, i produttori brasiliani mirano all'esportazione in Europa. **Frutticoltura**. v. 69, p. 60-65, 2007.

BENATTO, A.; SOUZA, M. T., SOUZA, M. T.; MÓGOR, A. F.; PIMENTEL, I. C.; ZAWADNEAK, M. A. C. Sampling methods and meteorological factors on pests and beneficial organisms in strawberries. **EntomoBrasilis**, v. 14, e926, 2021.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida. **FDACS - Division of Plant Industry**, Florida, 2010.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos e Alimentos**. 2016. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos> > Consultado em: 05 de jun de 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes da Área Vegetal, 2019**. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pncrc-vegetal/arquivos/21-portaria-no-267-de-11-de-dezembro-de-2019-publicacao-de-resultados-2015-a-2018.pdf> >. Consultado em: 07 Jun 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - **Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins** (AGROFIT). Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Consultado em: 15 mai 2021

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio\\_nacional\\_vigilancia\\_pop\\_populac\\_expostas\\_agrotoxicos.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_pop_populac_expostas_agrotoxicos.pdf)>. Consultado em: 05 jun 2021

BUDZINSKI, I. G. F.; MOON, D. H.; MOROSINI, J. S.; LINDÉN, P.; BRAGATTO, J.; MORITZ, T.; LABATE, C. A. Integrated analysis of gene expression from carbon metabolism, proteome and metabolome, reveals altered primary metabolism in *Eucalyptus grandis* bark, in response to seasonal variation. **BMC Plant Biology**, Piracicaba, v. 16, n. 149, p. 1-15, 2016.

CARVALHO, S.P. Histórico e evolução da cultura do morangueiro no Brasil nos últimos 50 anos. **Revista de Horticultura Brasileira**, Viçosa, v. 29, n. 2, CD-ROM, 2011

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, Quebec, e86, v. 68, 2019.

DING, J.-L.; HOU, J.; FENG, M.-G.; YING, S.-H. Transcriptomic analysis reveal comprehensive responses of insect hemocytes to mycopathogen *Beauveria bassiana*, and fungal virulence-related cell wall protein assists pathogen to evade host cellular defense. **Virulence**, Hangzhou, v. 11, n. 1, p. 1352-1365, 2020.

EFIL, L.; ÖZGÜR, O.; EFIL, F. A new pest, *Duponchelia fovealis* Zeller, on strawberries in Turkey: damage, distribution and parasitoid. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, Bingöl, v. 2, p. 328-334, 2014

EILENBERG, J. A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biological Control**, Frederiksberg, v. 46, p. 387-400, 2001.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMITZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 109-120, 2011.

FUENTES, A.; ALMONACID, L.; OCAMPO, J. A.; ARRIAGADA, C. Synergistic interactions between a saprophytic fungal consortium and *Rhizophagus*

*irregularis* alleviate oxidative stress in plants grown in heavy metal contaminated soil. **Plant Soil**, Temuco, v. 407, p. 355-366, 2016.

FRAGA-CORRAL, M.; CARPENA, M.; GARCIA-OLIVEIRA, P.; PEREIRA, A. G.; PRIETO, M. A.; SIMAL-GANDARA, J. Analytical metabolomics and application in health, environmental and food science. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Bragança, p. 1-23, 2020.

GIBSON, D. M.; DONZELLI, B. G. G.; KRASNOFF, S. B.; KEYHANI, N. O. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural Product Reports**, New York, v. 31, n. 10, p. 1287-1305, 2014.

GONÇALVES, R. B. **Parâmetros biológicos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) em dieta artificial**. 2012, Monografia – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GUPTA, S.; DIKSHIT, A. K. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. **Journal of Biopesticides**, New Delhi, v. 3, n. 1, p. 186-188, 2010

HAJEK, A. E.; DELALIBERA JR, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **Biological Control**, Ithaca, v. 55, p. 147-158, 2010.

HARITH-FADZILAH, N.; GHANI, I. A.; HASSAN, M. Omics-based approach in characterizing mechanisms of entomopathogenic fungi pathogenicity: A case example of *Beauveria bassiana*. **Journal of King Saud University - Science**, Selangor, v. 33, p. 101332, 2020.

HE, Z.; ZHAO, X.; LU, Z.; WANG, H.; LIU, P.; ZENG, F.; ZHANG, Y. Comparative transcriptome and gene co-expression network analysis reveal genes and signaling pathway adaptively response to varied adverse stress in the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Chongqing, v. 151, p. 169-181, 2018.

HMDB - THE HUMAN METABOLOME DATABASE. Canadá, 2007-2020.

JONSSON, P.; JOHANSSON, A. I.; GULLBERG, J.; TRYGG, J.; JIYE, A.; GRUNG, B.; MARKLUND, S.; SJÖRSTRÖM, M.; ANTTI, H.; MORITZ, T. High-Throughput Data Analysis for Detecting and Identifying Differences between

Samples in GC/MS-Based Metabolomic Analyses. **Analytical Chemistry**, Umea, v. 77, n. 17, p. 5635-5642, 2005.

KHACHATOURIANS, G. G.; QAZI, S. S. Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and Molecular Biology. In: BRAKHAGE, A. A.; ZIPFEL, P. F. (Eds.). **Human and Animal Relationships: The Mycota VI**. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag, 2008. p. 33-61.

KELLER, N. P. Fungal Secondary Metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, Wisconsin, v. 17, p. 167-180, 2019.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, Wisconsin, v. 3, n. 12, p. 937-947, 2005.

MADAIL, J. C. M. Panorama econômico. pp 15-33. IN: ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, J.; SCHWENGBER, J. E. (Editores Técnicos). **Morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 589 p.

MYERS, J. H.; CORY, J. S. **Biological Control Agents: Invasive Species or Valuable Solutions?** In: Impact of Biological Invasions on Ecosystem Services. Springer International Publishing, p. 191-202. 2017.

NAZ, S.; SANTOS, D. C. M.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Analytical protocols based on LC-MS, GC\_MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. **Bioanalysis**, Madrid, v. 6, n. 12, p. 1657-1677, 2014.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus insect cuticle. **Insects**, Gainesville, v. 4, n. 3, p. 357-374, 2013.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Molecular genetics of *Beauveria bassiana* infection of insects. **Advances in Genetics**, Gainesville, v. 94, p. 165-249, 2016.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Morango: Uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Journal of Chromatographic Science**, Campinas, v. 4, n. 1, p. 52–76, 2012.

PARANÁ - SEAB. Secretaria de Agricultura e do Abastecimento. **Produção de Morango se destaca na região de Curitiba e cresce no Paraná. 2021.**



Disponível em < <https://www.agricultura.pr.gov.br/Noticia/Producao-de-morango-se-destaca-na-regiao-de-Curitiba-e-cresce-no-Parana#>>. Consultado em: Jun de 2021.

PARABÁ - SEAB. Secretaria de Agricultura e do Abastecimento. **DERAL – PROGNÓSTICO FRUTICULTURA - 2019**. Disponível em < <https://www.agricultura.pr.gov.br/Pagina/Frusicultura-48> >. Consultado em: Jun de 2021.

PARRA, J. R. P.; JUNIOR, A. C. Applied Biological Control in Brazil: From Laboratory Assays to Field Application. **Journal of Insect Science**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 5, 2019.

PELL, J. K.; HANNAM, J. J.; STEINKRAUS, J. J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, Hertfordshire, v. 55, p. 187–198, 2010.

POITEVIN, G.C.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, Curitiba, v. 53(3), p. 323-331, 2018.

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, Shangai, v. 83, p. 96-103, 2018.

QUESADA-MORAGA, E.; CARRASCO-DÍAZ, J.A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, Cordoba, v. 130, n. 8, p. 442-452, 2006

SANTHANAM, R.; LUU, T. V.; WEINHOLD, A.; GOLDBERG, J.; OH, Y.; BALDWIN, I. T. Native root-associated bacteria rescue a plant from sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. **Proceedings of National Academy of Sciences PLUS**, Jena, v. 112, n. 36, p. 5013-5020, 2015.

SANTHANAM, R.; MENEZES, R. C.; GRABE, V.; LI, D.; BALDWIN, I. T.; GROTEN, K. A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. **Molecular Ecology**, Jena, v. 28, n. 5, p. 1154-1169, 2019.

SHARMA, C. K.; VISHNOI, V. K.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mug bean. **Rhizosphere**, Haridwar, v. 5, p. 71-75, 2018.

SILVA, V. C. A.; BARROS, R.; MARQUES, J. E.; TORRES, J. B. Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**, Recife, v. 32, n. 4, p. 653–658, 2003.

SOUZA, M. T.; ZAWADNEAK, M. A. C. Monitorando e aprendendo o manejo das pragas do morangueiro. **Campo & Negócios Hortifruti**, v. 05, p. 58-61, 2018.

STUART, A. K. C.; FURUIE, J. L.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Increased mortality of the European Pepper Moth *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) using entomopathogenic fungi consortia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Curitiba, v. 177, p.107503, 2020.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **Biological Control**, Wageningen, v. 57, p. 1-20, 2012.

VANDENDRIESSCHE T.; KEULEMANS J.; GEERAERD A.; NICOLAI B. M.; HERTOEG M. L. A. T. M. Evaluation of fast volatile analysis for detection of *Botrytis cinerea* infections in strawberry. **Food Microbiology**, Leuven, v. 36, n. 1, p. 406-414, 2012.

VILAS-BÔAS, S. G.; BOMBERT, A. K. Análise de metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 9, n. 36, p. 58-69, 2006.

XIAO, G.; YING, S.-H.; ZHENG, P.; WANG, Z.-L.; ZHANG, S.; XIE, X.-Q.; SHANG, Y.; ST. LEGER, R. J.; ZHAO, G.-P.; WANG, C.; FENG, M. C. Genomic perspectives evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific reports**, Shanghai, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2012.

ZHANG, X.-U.; LI, Q.-H.; XU, Z.-D.; DOU, J.-J. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medicine science: a systematic review. **RSC Advances**, v. 10, p. 3092-3104, 2020.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; KUHN, T. A.; ARAUJO, E.; DOLCI, E.; SANTOS, B.; SILVA, C.; BENATTO, A.; VIDAL, H. **Novo Desafio. Cultivar HF** · agosto / setembro, Curitiba, p. 31-32, 2011.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; POLTRONIERI, A. S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A. M.; BOSBA, A. M.; PIMENTEL, I. C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, Curitiba, v. 114, p. 291-294, 2017.

ZAWADNEAK, M. A. C.; BOTTON, M.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; VIDAL, H. R.; BERNARDI, D. **Pragas do morangueiro**, in: ZAWADNEAK, M. A. C.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, Á.F. (Eds.), *Como produzir morangos 2ª. ed.* Ed. UFPR, Curitiba, 296p, 2018.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; PIMENTEL, I. C.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B., POLTRONIERI, A. S.; SOLIS, M. A. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, Curitiba, V. 34, n. 3, p. 91–95, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C.; VIDAL H. R.; SANTOS B. **Lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller**. In: Vilela, E. F., R. A Zucchi. (ed). *Pragas Introduzidas no Brasil, insetos e ácaros*, FEALQ, Piracicaba, Brasil, 2015.

# **3 CAPÍTULO I**

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 ARTIGO I – O ESTADO DA ARTE NO MANEJO DE *Duponchelia fovealis* EM MORANGUEIRO NO BRASIL E NO MUNDO.

#### RESUMO

A crescente demanda por alimentos de maior qualidade e mais seguros para o consumo, cresce a cada dia. Estratégias do Manejo integrado de Pragas (MIP), que reduzem as aplicações de defensivos químicos na lavoura, ganham cada vez mais espaço e apresentam efetividade com as vantagens de não poluir o meio ambiente e causar danos à saúde do consumidor. Altas populações de *Duponchelia fovealis* vem causando enormes perdas econômicas em morangueiro por ser uma praga exótica no Brasil e não possuir produtos registrados para seu controle. Em razão disso, os objetivos dessa revisão foram compilar informações sobre *D. fovealis* na agricultura e inferir tendências de temas das pesquisas realizadas ao longo do tempo. Ainda, apresentar um panorama geral sobre alternativas de manejo desta praga exótica. Para tal, foram avaliados artigos nacionais e internacionais, sem recorte temporal, pesquisados a partir das bases de dados: Google Scholar, PubMed, Scielo e Scopus, empregando-se como palavras-chave: *Duponchelia fovealis*, *European Pepper Moth* e Lagarta-da-coroa. Todos os artigos científicos, publicados ou indexados nas referidas bases de dados, que continham as palavras-chave em seu título e/ou resumo foram computados.

Palavras-chave: MIP. Controle Biológico. Lagarta-da-coroa. Revisão Bibliográfica.

## ABSTRACT

Along with the population exponential growth, also grows the demand for quality and safe food. Integrated Pest Management is one of the most usual strategies to efficient pest control. It reduces the amount of chemical products used in the field, promoting an environmentally and health safe farming. *Duponchelia fovealis* is an exotic pest, registered for the first time in Brazil in 2010, attacking strawberry fields. Brazil has no registered products for its control. Thus, *D. fovealis* is causing great economic losses to strawberry producers. As a result, the objectives of this review were to gather information of *D. fovealis* in agriculture and to infer trends in research themes carried out over time. Also, present an overview of management alternatives for this exotic pest. To this end, national and international articles were evaluated, with no time frame, searched from the databases: Google Scholar, PubMed, Scielo and Scopus. The keywords used were: *Duponchelia fovealis*, European Pepper Moth and Lagarta-da-coroa. All scientific articles, published or indexed in the databases, which contained the keywords in their title and/or abstract were computed.

**Keywords:** IPM. Biological Control. European Pepper Moth. Literature Review.

## 1 INTRODUÇÃO

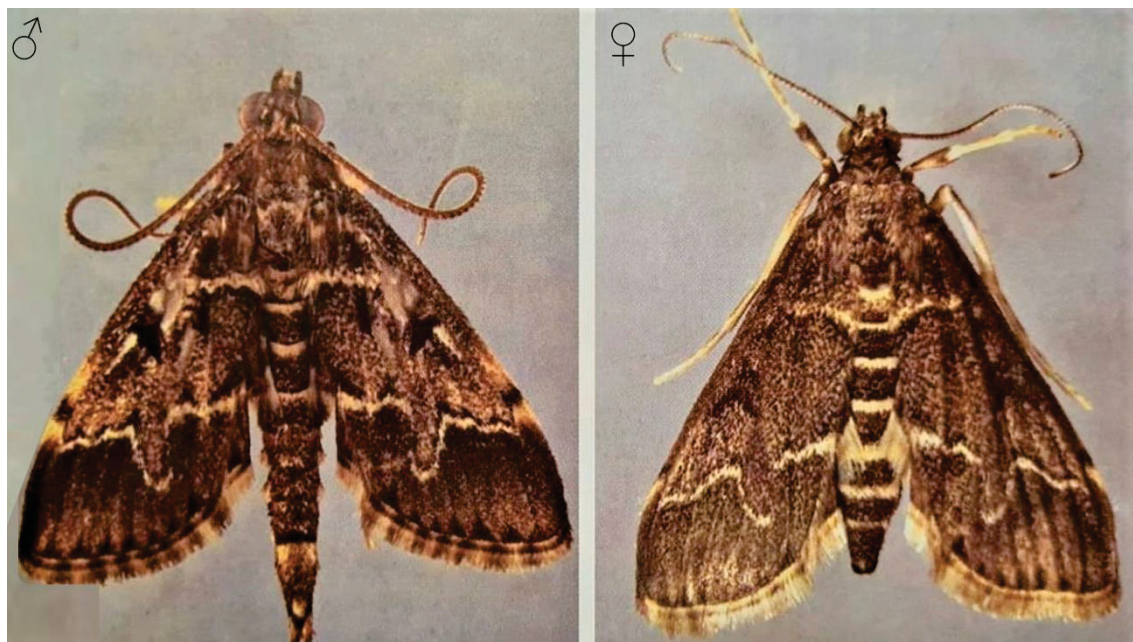
A cultura do morangueiro (*Fragaria × ananassa* Duch.) é uma das mais importantes ao redor do mundo dada sua relevância econômica e social, e por possuir papel fundamental na geração de empregos, além de representar a principal fonte de renda para diversas famílias brasileiras (CARVALHO, 2011; VANDENDRIESSCHE et al., 2012; MADAIL, 2016, PARANÁ - SEAB, 2021). Este fruto de pequeno porte é também o de maior expressão econômica no Brasil e isso se dá pela alta apreciação do seu doce sabor e aroma (ANTUNES e JUNIOR, 2007 FACHINELLO et al., 2011). O consumo e comércio deste fruto vem apresentando relevante aumento na América Latina nas últimas décadas e no Brasil, representa importante parcela Valor Bruto de Produção (VBP) de frutos anual (ANTUNES, BONOW E JUNIOR, 2020). O estado do Paraná é o segundo maior produtor de morangos no país, atrás apenas de Minas Gerais, com uma área de produção próxima a mil hectares, mais de 30 mil toneladas de morango e VBP de mais de R\$ 205 milhões em 2019, correspondente a 12,5% do valor gerado pela fruticultura (ANTUNES, BONOW E JUNIOR, 2020; PARANÁ - SEAB, 2019).

Um dos maiores desafios do cultivo do morangueiro é a incidência de pragas (ZAWADNEAK et al., 2018; SOUZA e ZAWADNEAK, 2018; BENATTO et al., 2021). Neste contexto, a mariposa *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) (Figura 1) é uma das mais importantes pragas que acomete esta cultura. *Duponchelia fovealis* é nativa das regiões Mediterrânea, Ilhas Canárias, Síria e Argélia, e ocorre principalmente em países da Europa, Ásia, África e Américas, com registro mais recente no México (BARDET, 2008; BONSIGNORE e VACANTE, 2010; EFIL, ÖZGÜR e EFIL, 2014; CABI, 2021, CRUZ-ESTEBAN e ROJAS, 2021), causando importantes perdas econômicas. No Brasil, é uma praga exótica e seu primeiro registro no morangueiro ocorreu em 2010, no estado do Paraná (ZAWADNEAK et al., 2011; 2016).

As lagartas desta espécie atacam diversas estruturas da planta, perfuram a coroa, comprometendo a circulação de nutrientes e favorecendo a ação de fitopatógenos, além de causar danos nas folhas, flores e morangos. Além disso, a redução da área foliar causada pela alimentação das lagartas, prejudica a fotossíntese e a qualidade dos morangos, deixando as plantas

sensibilizadas, acarretando redução em sua produtividade e podendo levar à morte precoce da muda (EFIL, ÖZGÜR e EFIL, 2014; ZAWADNEAK, VIDAL e SANTOS, 2015; ZAWADNEAK et al., 2016, 2018).

FIGURA 1 - ADULTOS DE *Duponchelia fovealis*.



FONTE: ZAWADNEAK et al. (2018)

LEGENDA: ♂) macho.

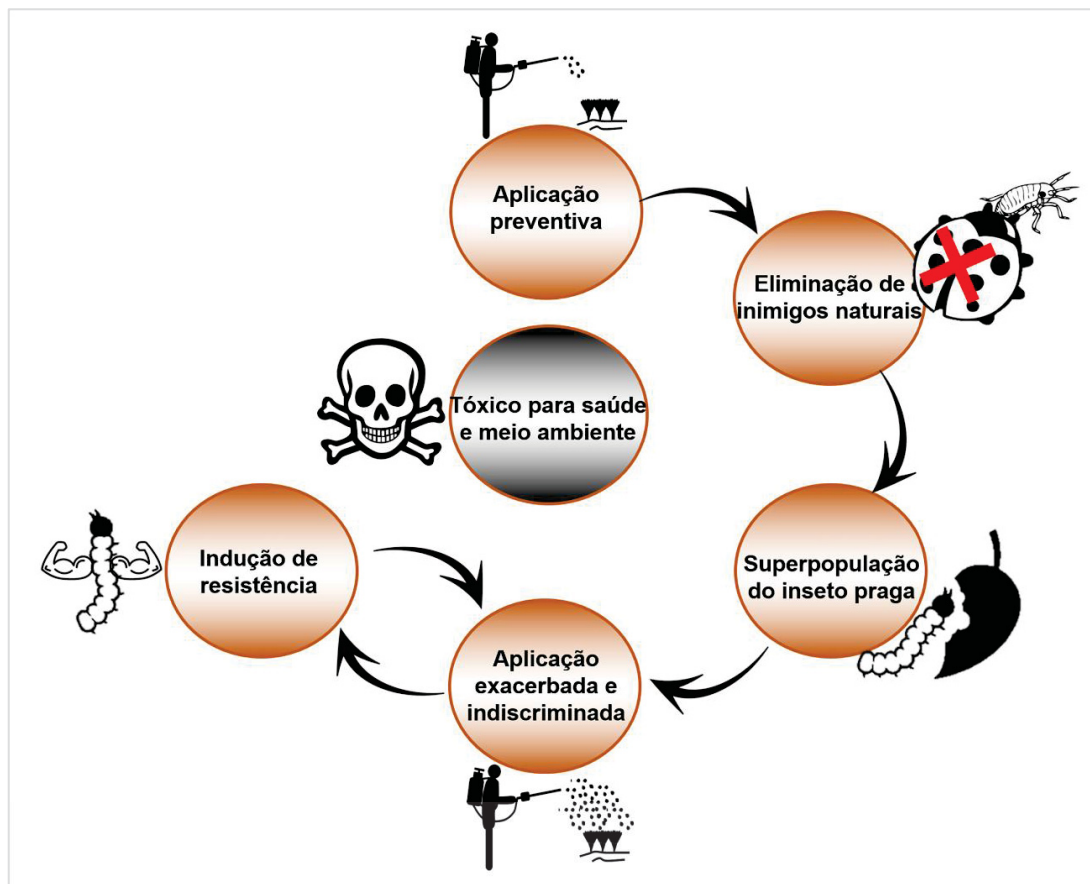
♀) fêmea.

Essa praga ocorre causando injurias ao longo de todo o ciclo da cultura e seu controle é dificultado devido ao comportamento das lagartas, que permanecem na parte basal da planta, protegida nas bainhas da coroa (BRAMBILA e STOCKS, 2010; ZAWADNEAK et al., 2018).

A dificuldade em proteger a cultura contra essa e outras pragas leva ao uso em larga escala e indiscriminado de inseticidas, e a aplicação desses agrotóxicos muitas vezes ocorre de forma preventiva, ou seja, sem monitorar presença de pragas na cultura (OSHITA e JARDIM, 2012; VANDENDRIESSCHE et al., 2012; BERNARDI et al., 2015). Essa prática gera problemas principalmente devido à potente ação poluidora destes agroquímicos, bem como a potencial indução de resistência em insetos praga (VAN LENTEREN, 2012). Além disso, devido à ação de amplo espectro de alguns inseticidas, que agem não apenas contra organismos prejudiciais, mas também contra os benéficos que atuam como inimigos naturais, promovendo o equilíbrio populacional de algumas espécies (VAN LENTEREN, 2012) (Figura 2).



FIGURA 2 - ESQUEMA DA UTILIZAÇÃO INDISCRIMINADA DE AGROTÓXICOS E SUAS CONSEQUÊNCIAS.



FONTE: A autora (2021)

Outro fator preocupante decorrente da aplicação de inseticidas é o alto número de intoxicações em humanos e animais domésticos (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Alguns dos agrotóxicos utilizados para controle de pragas são tóxicos o que pode acarretar o aparecimento de sintomas adversos e, em casos mais graves, levar a morte se usados de forma inadequada. A contaminação com estes agrotóxicos pode ocorrer tanto na população em geral, por consumir produtos contaminados, como em trabalhadores rurais, sendo que a maioria dos óbitos por intoxicação com inseticidas são de trabalhadores que entram em contato constante com estes agroquímicos sem os equipamentos de proteção, seja por falta de capacitação ou simplesmente, por negligência. A aplicação indiscriminada de agrotóxicos, deixa resíduos nos frutos que, na sua maioria, são consumidos *in natura*, o que faz do morango um dos produtos agrícolas com maior residual de agroquímicos

no país de acordo com os últimos relatórios expedidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL - ANVISA, 2016; BRASIL - MAPA, 2019).

No Brasil inexistem inseticidas registrados para emprego no controle de *D. fovealis* (BRASIL - AGROFIT, 2021) justificando a busca por estratégias que implementem o Manejo Integrado de Pragas (MIP). O MIP é formado por diversas estratégias de controle, sendo o controle biológico de pragas (CBP) uma das alternativas mais promissoras. CBP é definido como a utilização de um organismo para reduzir a densidade populacional de outro organismo, e demonstra grande eficácia no controle de pragas de diversas culturas, além de não apresentar toxicidade ao meio ambiente (ALVIN, MILLER e NEILAN, 2014). Além disso, é considerado uma solução efetiva e permanente, capaz de reduzir os danos causados por pragas exóticas, bem como reduzir a aplicação de inseticidas (MYERS e CORY, 2017). Neste método de controle são empregados organismos predadores, parasitoides, microrganismos (como bactérias, vírus e fungos), extratos vegetais, feromônios, dentre outros (HAJEK e DELALIBERA JR, 2010). O número de estudos com esta praga vem crescendo de forma exponencial nos últimos anos, sendo o Brasil, líder em publicações com esse tema (GONÇALVES et al., 2021). Dessa forma, no presente trabalho, trazemos artigos que abordam o controle de *D. fovealis*, buscando compilar informações sobre essa praga na agricultura e ainda, apresentar um panorama geral sobre alternativas de manejo desta praga exótica.

## 2 DESENVOLVIMENTO

Para a realização desta revisão científica foram avaliados, sem recorte temporal, artigos nacionais e internacionais, pesquisados a partir das bases de dados: Google Scholar, PubMed, Scielo e Scopus, empregando-se como palavras-chave: *Duponchelia fovealis*, *European Pepper Moth* e Lagarta-da-coroa. Todos os artigos científicos, publicados ou indexados nas referidas bases de dados, que continham as palavras-chave em seu título e/ou resumo foram computados.

### 2.1 MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS DO MORANGUEIRO

A aplicação de inseticidas sintéticos é o primeiro método utilizado no controle de pragas em morangueiro na pré e pós-colheita ao redor do mundo. Em 2008 o Brasil passou a liderar a corrida pelo consumo de agrotóxicos, tornando-se o maior consumidor do mundo destes produtos, sendo que, somente no estado do Paraná foram consumidos mais de 92 milhões de quilos de defensivos agrícolas químicos no ano de 2017 (PARANÁ - SESA, 2019). Este hábito, faz do morango um dos produtos com maior índice de inconformidade nas análises de resíduos, realizadas pelo MAPA, tendo sido detectados agroquímicos não permitidos para esta cultura, além de valores acima do limite máximo de resíduos tolerados (BRASIL - MAPA, 2019), constituindo um grande problema sanitário envolvendo a saúde do produtor, do consumidor e o meio ambiente.

Os agrotóxicos sintéticos são amplamente utilizados na agricultura para o controle de pragas, porém diversos são os efeitos negativos acarretados pela sua aplicação. Dentre eles a contaminação de águas e solos, os efeitos em organismos não alvo, o surgimento de populações de pragas resistentes e a distribuição de alimentos contendo resíduos de agroquímicos que podem ser nocivos à saúde do consumidor, são os principais. Estes e outros problemas têm estimulado investigações em estratégias alternativas para o controle de pragas e patógenos (ZAKER et. al., 2014). Desta forma, buscando controlar pragas e doenças, e reduzir os resíduos deixados por agroquímicos, bem como os danos

causados ao meio ambiente e ao homem, a implementação de estratégias de MIP e de CBP tornam-se importantes alternativas para a agricultura no Brasil.

O MIP foi proposto pela primeira vez em 1939 e vem sendo discutido e aprimorado desde então, sendo definido como a agregação de diferentes técnicas e abordagens de manejo, baseadas em parâmetros ecológicos, econômicos e toxicológicos, que sejam compatíveis entre si, e utilizadas em conjunto para o controle populacional da praga em questão, mantendo-a abaixo dos níveis capazes de causar perdas econômicas (WAQUIL, 2002).

No morangueiro a primeira ação adotada como base para o MIP é o monitoramento periódico da lavoura, que pode ser realizado através de armadilhas e de inspeção visual, e que se faz fundamental para detectar pragas em estágio inicial de instalação (ZAWADNEAK et al., 2018; BENATTO et al., 2021). Após a detecção da praga na cultura, e de possíveis inimigos naturais, são tomadas então decisões estratégicas de controle, priorizando métodos culturais, físicos e biológicos e, apenas como última alternativa, o controle químico (ZAWADNEAK et al., 2018). O nível da infestação deve ser levado em consideração durante a decisão de aplicar ou não o defensivo químico, lembrando sempre de que seu uso pode implicar em um maior custo de produção, risco de intoxicação e contaminação do meio ambiente (ZAWADNEAK et al., 2020). Por isso a adoção acertada de estratégias de MIP leva à produção de um morango de maior qualidade, mais seguro e competitivo (ZAWADNEAK et al., 2018).

Dentre todas as estratégias usadas dentro do MIP, o controle biológico de pragas (CBP) destaca-se por sua alta efetividade e aplicabilidade aos mais variados tipos de pragas, bem como por ser seguro à saúde e ao meio ambiente (RUSCH, BOMMARCO e ECKBOM, 2016; PARRA, 2019). Este método é um fenômeno que consiste na utilização de um organismo para o controle da população de outro organismo e é amplamente utilizado para o controle de pragas, visando a diminuição de sua densidade populacional e a redução da capacidade de causar danos (EILENBERG E LOMER, 2001; VAN LENTEREN, 2012; PARRA E JUNIOR, 2019). Como estratégia, o CBP é frequentemente utilizado quando espécies exóticas se estabelecem em novas áreas e, por não possuírem inimigos naturais, acabam atingindo alta densidade populacional. A introdução de agentes de biocontrole pode então regular o desenvolvimento da

praga emergente (HAJEK e DELALIBERA JR, 2010). Neste contexto, CBP é a única solução duradoura capaz de reduzir os danos causados por pestes e patógenos (MYRES e CORY, 2017; PARRA, 2019), bem como apresenta inúmeras vantagens ambientais como a manutenção da diversidade biológica, e à saúde do consumidor e do trabalhador, por não apresentar toxicidade (RUSCH, BOMMARCO e ECKBOM, 2016). Outra vantagem é sua alta especificidade pela praga alvo, atuando sem interferir no desenvolvimento da população benéfica para a planta e antagônica à praga. Já os agrotóxicos sintéticos podem afetar organismos não-alvo, podendo agravar pragas antes consideradas secundárias (BALE, VAN LENTEREN e BIGLER, 2008). Além disso seu custo de desenvolvimento representa 1% do valor gasto com o desenvolvimento de sintéticos (VAN LENTEREN, 2012; MYERS e CORY, 2017).

Assim sendo, a adoção de estratégias de MIP e CBP são as melhores escolhas tanto para o controle populacional de pragas como para manter a segurança do consumidor e do meio ambiente.

## 2.2 INCIDÊNCIA DE *Duponchelia fovealis* NO MORANGUEIRO

Dentre as pragas do morangueiro destaca-se a mariposa *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) por sua grande dificuldade de controle (STOCKS e HODGES, 2012). No Brasil, ela foi detectada pela primeira vez em morangueiro pela equipe do Grupo Técnico da Produção Integrada do Morangueiro (PIMo), em 2008 no município de São José dos Pinhais, e sua identificação ocorreu efetivamente em 2010, sendo descrita como uma praga exótica capaz de atuar sobre todas as partes da planta, como coroa, folhas, flores e frutos do morangueiro e causando imensas perdas econômicas (ZAWADNEAK *et al.*, 2011; 2016).

As lagartas dessa espécie são polípagas, podendo atacar plantações como pimenta (*Capsicum annum*), beterraba (*Beta vulgaris*), manjericão (*Ocimum basilicum*), amora (*Rubus fruticosus*), tomate (*Solanum lycopersicum*), milho (*Zea mays*), morango (*Fragaria x ananassa*), e também plantas ornamentais como azaleia (*Rhododendron spp.*), begônia (*Begonia spp.*) e orquídea (*Phalaenopsis spp.*) (BRAMBILA e STOCKS, 2010; STOCKS e HODGES, 2012; ZAWADNEAK, VIDAL e SANTOS, 2015), totalizando cerca de

73 espécies de plantas (ZAWADNEAK, VIDAL e SANTOS, 2015). As plantas atacadas por *D. fovealis* apresentam folhas manchadas, com furos, murchas e embranquecidas. Quando há infestação severa, as plantas ficam enfraquecidas, havendo diminuição da produtividade e podendo ocorrer a morte precoce da planta. Esta praga possuiu alto potencial de injurias devido à presença de lagartas ao longo de todo o ciclo da cultura, bem como seu hábito críptico que dificulta o alcance dos agrotóxicos (BRAMBILA e STOCKS, 2010; ZAWADNEAK *et al.*, 2016). Além disso, a ausência de produtos para seu controle no Brasil, agrava ainda mais o uso indiscriminado de agroquímicos nesta cultura.

### 2.3 MANEJO DE *Duponchelia fovealis* EM MORANGUEIRO

Por ser uma praga exótica, ou seja, não ser nativa do Brasil, não existe método de controle validado para as condições brasileiras até o presente momento (ZAWADNEAK *et al.*, 2018), entretanto recomenda-se realização de uma validação visual inicial, visando a detecção da praga na cultura, além de que armadilhas luminosas e lâmpadas fluorescentes podem ser utilizadas para capturar o inseto adulto. Além disso, recomenda-se realizar a manutenção da limpeza da cultura, como retirada de folhas secas, frutos danificados e mudas mortas pelo ataque da praga, visando a retirada do foco da mesma (ZAWADNEAK, SCHUBER e MÓGOR, 2018). Nesta sessão apresentamos alguns dos mais recentes trabalhos que estudam as diferentes metodologias de controle de insetos, aplicados no controle de *D. fovealis* (TABELA 1).

#### 2.3.1 Controle químico

Lagartas de *D. fovealis* possuem algumas características que podem dificultar seu controle por inseticidas de contato, como seu hábito de permanecer na parte basal do morangueiro (BRAMBILA e STOCKS, 2010; ZAWADNEAK *et al.*, 2016). No Brasil não existe registro de inseticidas químicos para emprego no controle de *D. fovealis* (BRASIL - AGROFIT, 2021), entretanto estudos aparentam ser promissores quanto a efetividade de alguns defensivos químicos. É o caso do trabalho publicado por Santos e colaboradores (2019), no qual os autores estudaram 12 defensivos de diferentes grupos químicos e de distintos modos de ação. O grupo verificou que 3 defensivos (clorfenapir, lambda-

cialotrina + clorantraniliprole e indoxacarbe) demonstraram ação satisfatória no controle de lagartas de 2º instar de *D. fovealis*, com mortalidades de 70%, 80% e 100% respectivamente. O inseticida indoxacarbe foi o que apresentou maior toxicidade (LC<sub>50</sub> 0.08 mg a.i./L), 800 vezes maior do que o menos tóxico (clorfenapir - LC<sub>50</sub> 64 mg a.i./L). Dos ingredientes ativos estudados, apenas o clorfenapir é aprovado pelo MAPA, para uso na cultura do morango no Brasil (TABELA 3), entretanto esta permissão não se estende à *D. fovealis*. Dessa forma, apesar de aparentemente promissores, os inseticidas indoxacarb, clorfenapir e lambda-cialotrina + clorantraniliprole precisam ter sua eficácia validada em campo e, em caso de comprovação de sua ação, seu uso deve ser liberado junto ao Ministério de Agricultura.

Outros dois estudos realizados nos Estados Unidos avaliaram o uso de defensivos químicos contra *D. fovealis*. Mey e Bethke (2011) avaliaram a ação de 6 diferentes produtos aplicados através de rega e *spray*. O produto que obteve melhor ação contra a lagarta foi o orthene, aplicado por *spray*, que apresentou mortalidade de 60% no primeiro dia após a aplicação. Ao quarto dia de experimento a mortalidade subiu para 92% com o uso de orthene *spray* e 82% orthene rega, seguido por F7954 (abamectina + bifentrina) com 64% de mortalidade e Proclaim + Dyne-amic com 55%. Dos três produtos que apresentaram melhor resultado, orthene possui aprovação para uso no Brasil, entretanto não para a cultura do morango, da mesma forma que Proclaim e a bifentrina. A abamectina, por sua vez é autorizada para uso no morango, porém não existe produto formulado entre abamectina e bifentrina aprovado no Brasil (BRASIL – AGROFIT, 2021). No estudo de Frank e Nagle (2021) foram avaliados quatro inseticidas comerciais: permetrina, Acelepryn® (clorantraniliprole), Sarisa® (cyclaniliprole) e Pradia® (cyclaniliprole e flonicamida). Destes, com exceção da permetrina, todos apresentaram mortalidade de 100% após o sétimo dia de estudo. Dos ingredientes estudados, clorantraniliprole e flonicamida são aprovados no Brasil, mas não para uso em morango ou contra *D. fovealis*.

TABELA 3. INGREDIENTES ATIVOS APROVADOS PARA USO NA CULTURA DO MORANGUEIRO.

Nome Comum	Grupo Químico	Classe (s)
Abamectina	Avermectina	AC, IN, NEMA
Alfa-cipermetrina	Piretróide	IN
Azadiractina	Tetranotriterpenóide	IN
Azoxitrobina	Estrobilurina	FUN
Boscalida	Anilida	FUN
Brometo de Metila	Alifático halogenado	FOR, FUN, HERB, IN, NEMA
Clorfenapir	Análogo de Pirazol	AC, IN
Cloridrato de Formetanato	Metilcarbamato de Fenila	AC, IN
Cresoxim-metílico	Estrobilurina	FUN
Difenoconazol	Triazol	FUN

FONTE: AGROFIT (2021).

LEGENDA: AC: acaricida, IN: inseticida, FUN: fungicida, NEMA: nematocida, FOR: formicida, HERB: herbicida.

De todos os ingredientes ativos avaliados nos diferentes estudos, apenas dois (clorfenapir e abamectina) são autorizados pelo MAPA para uso em morangueiro. Assim sendo, novos estudos de eficácia em diferentes concentrações bem como de eficácia em lavoura são necessários para aprofundar melhor as diferentes opções, bem como para uma melhor avaliação da sua real efetividade contra *D. fovealis*.

### 2.3.2 Inimigos naturais

Diversos inimigos naturais vêm sendo estudados ao longo dos anos, para controle de *D. fovealis*. O controle biológico natural desta praga também já foi observado em campo. No Brasil, o grupo de Zawadneak (2016), observou lagartas parasitadas por insetos do gênero *Apanteles* (Hymenoptera: Braconidae), além de ovos predados por ninfas e adultos de *Hyaliodocoris insignis* Stal. (Heteroptera: Miridae).

A utilização de inimigos naturais como ácaros e besouros parece ser promissora no controle dessa praga, conforme demonstrado por Messelink e Wensveen (2003). Eles avaliaram duas espécies de ácaros predadores: *Hypoaspis miles* Berlese e *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), e adultos do besouro *Atheta coriaria* Kraatz (Coleoptera: Staphiloinidae), também conhecida como *Dalotia coriaria*, contra ovos e lagartas de *D. fovealis*. Ambos ácaros e besouro demonstraram altas taxas de controle de ovos, sendo que *H. miles* foi superior que *H. aculeifer* (99% e 92% respectivamente). *A. coriaria* predou 50 – 80% dos ovos e 64% de lagartas de primeiro instar. Na Europa e



nos Estados Unidos, estes três agentes de biocontrole já são produzidos e comercializados para controle de *D. fovealis*, além também de três espécies de *Trichogramma* *T. evanescens*, *T. cacoeciae* e *T. brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (STOCK E HODGES, 2010; BRAMBILA E STOCKS, 2010). Desta forma a utilização destes insetos representa também uma alternativa para aplicação em campo para controle de *D. fovealis* no Brasil. Santos (2014), por sua vez, demonstrou a eficácia do inseto *Cortesia flavipes* Cam. (Hymenoptera: Braconidae) em parasitar lagartas de terceiro instar de *D. fovealis*. A autora observou taxa de parasitismo satisfatória (52%), entretanto as taxas de desenvolvimento para pupas (11%/lagarta) e emergência em adultos (2.8%) não foram suficientes, demonstrando que *C. flavipes* não está adaptada para o parasitismo de *D. fovealis*.

Em um estudo conduzido por Paes e colaboradores (2018a, b), insetos do gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) foram avaliados por seu potencial de parasitismo em ovos de *D. fovealis* em diferentes estágios de maturação. Duas linhagens, Tp18 (*T. pretiosum*) e TG (*T. galloi*), apresentaram taxa de parasitismo promissora de 50% e 90% respectivamente. O grupo também observou que *T. pretiosum* foi capaz de parasitar ovos em todos os estágios de maturação, enquanto *T. galloi* demonstrou preferência por ovos mais jovens. Apesar disso, a idade dos ovos não interferiu na taxa de emergência de adultos, no número de indivíduos emergentes por ovo nem na proporção de machos e fêmeas, demonstrando assim o alto potencial de controle do gênero *Trichogramma* para controle desta praga. Em outro estudo com as mesmas espécies de *Trichogramma* (*T. pretiosum* e *T. galloi*), Pirovani e colaboradores (2017) avaliaram a densidade ideal de parasitoides a serem liberados em campo, para controle de *D. fovealis* em morangueiro. No estudo foram liberadas fêmeas das duas espécies de *Trichogramma* em diferentes taxas: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 ovo de *D. fovealis*:parasitoide. O grupo constatou que a densidade ideal de liberação de fêmeas, para promover um bom controle de *D. fovealis* em campo, fica entre 4 e 8 parasitoides/ovo, o que se pode considerar uma quantidade razoavelmente baixa, quando comparado ao parasitismo em outras espécies de pragas.

Para utilização dos diferentes inimigos naturais em uma estratégia de MIP, faz-se necessária avaliar a compatibilidade entre os diferentes tipos de

tratamento a ser aplicado no campo. Abordagens como essa foram demonstradas no estudo de Rodrigues e colaboradores (2017), que avaliaram a compatibilidade de seis inseticidas reguladores de crescimento com três espécies de *Trichogramma* e seu efeito sobre o parasitismo em ovos de *D. fovealis*. O grupo demonstrou que a espécie mais resistente, ou seja, que apresentou menor redução no parasitismo dos ovos, foi *T. exiguum*, com menor parasitismo em ovos tratados com Pyroxyfen (22% dos ovos parasitados contra 61% do controle) e maior parasitismo em ovos tratados com o inseticida botânico azadiractina (48%). No caso de *T. galloi* o inseticida de maior impacto foi lufenuron, que reduziu o parasitismo para 8%, frente a 63% do controle, e o de menor impacto foi methoxifenozone, onde não houve diferença significativa no parasitismo (71%). Por fim, em *T. atopovirilia* o inseticida botânico azadiractina foi que apresentou maior impacto (15% dos ovos parasitados contra 74% do controle) e diflubenzuron com menor impacto (65%).

Levando em consideração dois possíveis predadores naturais de *D. fovealis*, Araujo e colaboradores (2020a) avaliaram a compatibilidade entre *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) com três linhagens de *Beauveria bassiana* (dois isolados e Bovemax®) e um produto comercial a base de *Metarhizium anisopliae* (Methamax®). O estudo demonstrou que *P. nigrispinus* é sensível aos tratamentos a base de fungos entomopatogênicos, aplicados diretamente no inseto, sendo que Bovemax® e Methamax® demonstraram mortalidade acima de 80%. A aplicação dos tratamentos sobre as lagartas que foram oferecidas como alimentação, não reduziu a taxa alimentar de nenhum dos insetos. Além disso, diferentes linhagens de *B. bassiana*, bem como de Bovemax® e Methamax®, não apresentaram ação deletéria na taxa de parasitismo em ovos de *D. fovealis* por *T. atopovirilia* e *T. pretiosum*, nem redução nas taxas de emergência de adultos e longevidade em números significativos (menos de 30%) (ARAUJO et al., 2020b). Esse tipo de estudo, é de extrema importância para a utilização comercial do inimigo natural em estratégias de MIP, uma vez que diferentes produtos serão aplicados no campo e, eventualmente, irão entrar em contato um com o outro, podendo então invalidar as ações de controle.

### 2.3.3 Controle Microbiológico

O controle microbiológico de insetos é amplamente utilizado no MIP e os principais microrganismos utilizados na pesquisa para manejo de *D. fovealis* são bactérias da espécie *Bacillus thuringiensis* (Bt) e fungos entomopatogênicos.

*Bacillus thuringiensis* produz cristais proteicos tóxicos quando ingeridos por insetos e são amplamente utilizados para controle de dípteros, ortópteros, himenópteros e principalmente contra lepidópteros (AZEVEDO, 1998, PARRA, 2019). A ação de Bt contra *D. fovealis* foi investigada por Benicá e colaboradores (2017), onde foram utilizados dois produtos comerciais Agree® e Dipel WP® em todos os estágios larvais da praga. Para ambos os produtos, as taxas de mortalidade foram altas nos primeiros estágios de desenvolvimento (Agree® - 100% e Dipel WP® - 76%), nos estágios posteriores Agree® manteve sua virulência alta (2º instar - 94%, 3º instar 91%) e apenas no 4º instar a virulência caiu para 55%. Dipel WP®, todavia, teve sua eficácia reduzida à medida que a lagarta se desenvolveu (2º instar - 60%, 3º instar - 31% e 4º instar - 19%). O uso de produtos formulados a base de Bt é recomendado em lagartas em estágio inicial de desenvolvimento (BETHKE E MEY, 2010) e seu uso contra *D. fovealis* é regulamentado na europa e nos Estados Unidos (BRAMBILA E STOCKS, 2010; STOCKS E HODGES, 2010).

Outro grupo de microorganismos que tem sido utilizado no controle de pragas são os fungos entomopatogênicos. Entre os gêneros mais utilizados no controle biológico encontram-se *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana* e o *Metarhizium anisopliae* (PARRA, 2019).

Estudos conduzidos no Brasil demonstram que a utilização de fungos dos gêneros *Beauveria* e *Isaria* apresenta alta patogenicidade contra *D. fovealis*. Em um estudo preliminar os pesquisadores demonstraram que, dentre 20 isolados de diferentes gêneros de fungos entomopatogênicos testados, dois isolados, sendo um de *B. bassiana* e um de *I. javanica*, foram os que apresentaram maior mortalidade em *D. fovealis* (CL<sub>50</sub> de  $2.33 \times 10^6$  e  $9.69 \times 10^5$  esporos.ml<sup>-1</sup> respectivamente). Além disso, foram conduzidos estudos em casa de vegetação, apresentando uma mortalidade de 45% com o uso de *I. javanica* e 52% com *B. bassiana*, demonstrando seu potencial uso para controle desta praga (AMATUZZI et al., 2018a). No mesmo ano Poitevin e colaboradores (2018)

isolaram diferentes espécies fúngicas de insetos infectados em cultivo de morango, como *Fusarium* spp., *Trichoderma atroviridae*, *T. harzianum*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Mucor nidicola* e *B. bassiana*. Após testar todos os fungos contra lagartas de *D. fovealis*, os pesquisadores constataram que apenas os isolados da espécie *B. bassiana* eram capazes de matar as lagartas. Duas linhagens foram selecionadas como as mais promissoras e, quando testadas frente a formulados comerciais (Bovemax® e Methamax®), apresentaram uma taxa de mortalidade similar aos mesmos (entre 70 – 80%), entrando para a lista dos fungos em potencial para uso no manejo de *D. fovealis*. Outras espécies de fungos como *Diaporthe endophitica* e *Purpureocillium lilacinus*, isolados como endofíticos de folhas de morango, também apresentaram excelente efetividade inseticida contra lagartas de *D. fovealis*, com mortalidades entre 61% e 88% respectivamente (AMATUZZI et al., 2018b).

Um estudo recente mostrou que o uso combinado de diferentes linhagens de *B. bassiana* é capaz de aumentar em até 17% a mortalidade de *D. fovealis* quando comparado ao uso dos fungos isoladamente, explanando ainda mais o uso de fungos para o controle desta praga (STUART et al., 2020). Desta forma, através da condução de diversos estudos, o uso de fungos entomopatogênicos vem apresentando grande significância como alternativa para o manejo de *D. fovealis*.

Nematóides entomopatogênicos também vem sendo estudados para o controle desta praga. Pirovani (2017) avaliou o potencial patogênico da linhagem comercial de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) Koppert® contra os diferentes estágios de desenvolvimento de *D. fovealis* (ovos, lagartas, pré-pupa e pupa) e observaram que lagartas de 4º instar e pré-pupa são altamente suscetíveis à *S. carpocapsae*, com CL<sub>50</sub> de 71,4 e 75,4 juvenis infectantes (JIs)/inseto, respectivamente. Podendo chegar a 100% de mortalidade na concentração de 400 JIs/inseto. O uso de nematóides como *Heterorhabditis bacteriophora* e *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) é regulamentado e indicado para controle de *D. fovealis* em morangueiros na Europa (STOCK E HODGES, 2010; BONSIGNORE E VACANTE, 2013).

O uso de microrganismos no controle de pragas não é novidade e vem sendo empregado há mais de 50 anos no controle de pragas e doenças (AZEVEDO, 1998). Ao longo destes anos muitos produtos vêm sendo lançados

e apresentam muito sucesso no MIP. Para a cultura do morango, não há produtos biológicos registrados e aprovados no Brasil, fazendo-se então necessária a submissão e aprovação junto ao órgão para uso no manejo de *D. fovealis*. Além disso, previamente à aprovação, estudos a nível de campo devem ser realizados para comprovar a eficácia destes organismos na lavoura.

#### 2.3.4 Extratos vegetais e óleos essenciais

Como as demais alternativas para o controle de pragas, os óleos essenciais (O.E) demonstram ser promissores por seu potencial inseticida (TRIPATHI et al., 2009; ISMAN, 2000).

O potencial de óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinalis*), cravo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), pitanga (*Eugenia brasiliensis*), limão siciliano (*Citrus limon*), laranja doce (*Citrus aurantium dulce*) e laranja amarga (*Citrus aurantium amara*) foi testado no controle de *D. fovealis* (ATAIDE, 2017). Todos os O.E.s foram pulverizados sobre lagartas a uma concentração de 2% (m/v). Os óleos mais promissores foram os de limão siciliano, laranja doce e gengibre, que acarretaram mortalidades de 100%, 100% e 98% respectivamente, em embriões. O O.E. de gengibre apresentou mortalidade de 98, 56 e 15% em lagartas de 1º, 2º e 3º instar, respectivamente, frente a 53% e 52% em lagartas de 1º instar, causada pelos óleos de limão siciliano e laranja doce. Os óleos de cravo, canela e pitanga apresentaram taxas de mortalidade inferiores (54%, 25% e 15% respectivamente) ao observado em gengibre, limão siciliano e laranja doce, em lagartas de 1º instar. De todos os óleos testados o de gengibre parece ser o mais eficaz, por causar mortalidades altas em diferentes estágios de maturação de *D. fovealis*.

Em outro estudo, Salomão (2014) avaliou a ação inseticida de extratos vegetais de alho (*Allium sativum*) e fumo (*Nicotina tabacum*). Os extratos foram aplicados por pulverização a uma concentração de 10% (m/v) sobre os diferentes estágios de maturação de *D. fovealis*. O extrato mais promissor foi o de fumo, por apresentar 98% de mortalidade em lagartas de 1º instar e 87% em lagartas de 2º instar, contra 35% e 15%, respectivamente, do extrato de alho. Os resultados apontam que o extrato de fumo pode constituir uma alternativa viável para compor estratégias de manejo de *D. fovealis*.

Estudos utilizando componentes botânicos não são tão comuns quanto aqueles utilizando microrganismos entomopatogênicos, por exemplo, entretanto, estes componentes podem ser tão promissores quanto as demais formas de controle, quando compoem uma estratégia de manejo integrado.

TABELA 1 – PRINCÍPIOS ATIVOS E PRODUTOS TESTADOS CONTRA OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *Duponchelia fovealis*. CONTINUA.

Princípio Ativo	Classificação	Estágio	Mortalidade	Referência
Clorfenapir	Químico	lagartas 2º instar	70%	Santos et al., 2019
Lambda-cialotrina + clorantilaniliprole	Químico	lagartas 2º instar	80%	
Indoxacarbe	Químico	lagartas 2º instar	100%	
Orthene	Químico	lagartas	92%	Mey e Bethke, 2011
Abamectina + Bifentrina	Químico	lagartas	64%	
Proclaim + Dune-amic	Químico	lagartas	55%	
Clorantilaniliprole	Químico	lagartas 2º e 3º instar	100%	Frank e Nagle, 2021
Cyclaniliprole	Químico	lagartas 2º e 3º instar	100%	
Cyclaniliprole + flonicamida	Químico	lagartas 2º e 3º instar	100%	
Permetrina	Químico	lagartas 2º e 3º instar	0%	
<i>Hypoaspis miles</i>	Biológico (inimigos naturais)	ovos	99%	Messelink e Wensween, 2003
<i>Hypoaspis aculeifer</i>	Biológico (inimigos naturais)	ovos	92%	
<i>Atheta coriaria</i> ( <i>Dalotia coriaria</i> )	Biológico (inimigos naturais)	ovos lagartas 1º instar	50-80% 64%	
<i>Cortesia flavipes</i>	Biológico (inimigos naturais)	lagartas 3º instar	52%	Santos, 2014
<i>Trichogramma pretiosum</i>	Biológico (inimigos naturais)	ovos	50%	Paes et al., 2018a e b
<i>Trichogramma galloi</i>	Biológico (inimigos naturais)	ovos	90%	
<i>Bacillus thuringiensis</i> (produto comercial Agree®)	Biológico (microbiológico)	lagartas 1º instar	100%	Benicá et al., 2017
		lagartas 2º instar	94%	
		lagartas 3º instar	91%	
		lagartas 4º instar	55%	
<i>Bacillus thuringiensis</i> (produto comercial Dipel WP®)	Biológico (microbiológico)	lagartas 1º instar	76%	
		lagartas 2º instar	60%	
		lagartas 3º instar	31%	
		lagartas 4º instar	19%	

TABELA 1 – PRINCÍPIOS ATIVOS E PRODUTOS TESTADOS CONTRA OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *Duponchelia fovealis*. CONCLUSÃO.

Princípio Ativo	Classificação	Estágio	Mortalidade	Referência	
<i>Beauveria bassiana</i>	Biológico (microbiológico)	lagartas 3 <sup>o</sup> instar	52%	Amatuzi et al., 2018a	
<i>Isaria javanica</i>	Biológico (microbiológico)	lagartas 3 <sup>o</sup> instar	45%		
<i>Beauveria bassiana</i>	Biológico (microbiológico)	lagartas 3 <sup>o</sup> instar	70 - 80%	Poitevin et al., 2018	
<i>Diaporthe endophytica</i>	Biológico (microbiológico)	lagartas	61%	Amatuzi et al., 2018b	
<i>Purpureocillium lilacinus</i>	Biológico (microbiológico)	lagartas	88%		
<i>Steinernema carpocapsae</i>	Biológico (nematóides)	lagartas 4 <sup>o</sup> instar	100%	Pirovani, 2017	
		pré-pupa	100%		
<i>Zingiber officinalis</i> (gengibre)	Biológico (óleos essenciais)	lagartas 1 <sup>o</sup> instar	98%	Ataide, 2017	
		lagartas 2 <sup>o</sup> instar	56%		
		lagartas 3 <sup>o</sup> instar	15%		
<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo)	Biológico (óleos essenciais)	lagartas 1 <sup>o</sup> instar	54%		
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	Biológico (óleos essenciais)	lagartas 1 <sup>o</sup> instar	24%		
<i>Eugenia brasiliiana</i> (pitanga)	Biológico (óleos essenciais)	lagartas 1 <sup>o</sup> instar	15%		
<i>Citrus limon</i> (limão siciliano)	Biológico (óleos essenciais)	lagartas 1 <sup>o</sup> instar	100%		
<i>Citrus aurantium dulce</i> (laranja doce)	Biológico (óleos essenciais)	lagartas 1 <sup>o</sup> instar	100%		
<i>Allium sativum</i> (alho)	Biológico (óleos essenciais)	lagartas 1 <sup>o</sup> instar	35%	Salomão, 2014	
		lagartas 2 <sup>o</sup> instar	15%		
<i>Nicotina tabacum</i> (tabaco)	Biológico (óleos essenciais)	lagartas 1 <sup>o</sup> instar	98%		
		lagartas 2 <sup>o</sup> instar	87%		
<i>Trichogramma exiguum</i> + Pyroxyfen	Uso Combinado	Ovos	22%		Rodrigues et al., 2017
<i>Trichogramma exiguum</i> + Azadiractina	Uso Combinado	Ovos	48%		
<i>Trichogramma galloi</i> + Lufenuron	Uso Combinado	Ovos	8%		
<i>Trichogramma galloi</i> + Metoxifenoziide	Uso Combinado	Ovos	71%		
<i>Trichogramma atopovirilia</i> + Azadiractina	Uso Combinado	Ovos	15%		
<i>Trichogramma atopovirilia</i> + Diflubenzuron	Uso Combinado	Ovos	65%		

FONTE: A autora (2021).

### 3 CONCLUSÃO

Face a todos os estudos apresentados nesta revisão observamos que diferentes métodos de manejo vêm apresentando alta eficácia no controle de *D. fovealis* em laboratório, como a utilização de inimigos naturais, de fungos entomopatogênicos, óleos essenciais, extratos vegetais e até mesmo de inseticidas químicos. Entretanto ainda são necessários estudos que levem estes agentes para a lavoura, para validar sua efetividade na cultura do morango. Apesar disso, estratégias de manejo integrado de pragas, onde associam-se diferentes ferramentas de controle, parecem ser promissoras, uma vez que cada um dos métodos utilizados cobrem uma lacuna no controle desta praga.



## REFERÊNCIAS

ALVIN A.; MILLER K. I.; NEILAN B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds.

**Microbiological Research**, Sydney, v. 169, p. 483-495, 2014.

AMATUZZI, R. F.; POITEVIN, C. G.; POLTRONIERI, A. S.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to Soil-Borne Entomopathogenic Fungi. **Insects**, Curitiba, v.9, n. 2, p. 70, 2018a.

AMATUZZI, R. F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; DALZOTO, P.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, Curitiba, v.78, n. 3, p. 429-435, 2018b

ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; JUNIOR, C. R. Morango – Crescimento constante em área de produção. **Anuário HF 2020 - Campo e Negócios**, p. 88-92, 2020.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C. Fragoli, i produttori brasiliani mirano all'esportazione in Europa. **Frutticoltura**. v. 69, p. 60-65, 2007.

ARAÚJO, E. S.; BENATTO, A.; RIZZATO, F. B.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Combining biocontrol agentes with different mechanisms of action to control *Duponchelia fovealis*, an invasive pest in South America. **Crop Protection**, Curitiba, v. 134, p. 105184, 2020a.

ARAÚJO, E. S.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; MIRÁS-AVALOS, J. M.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Compatibility between entomopathogenic fungi and egg parasitoid (Trichogrammatidae): A laboratory study for their combined use to control *Duponchelia fovealis*. **Insects**, Curitiba, v. 11, n. 9, p. 1-14, 2020b.

AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: DE MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Vol. 1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. 69-96.

BALE J. S.; VAN LENTEREN J. C.; BIGLER F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transaction of The Royal Society B**, Birmingham, v. 363, p. 761-776, 2008.

BARDET, A. **Main phytosanitary problems on strawberry in France.** COST863 WG2 and WG3 Joint SGM, Plant health in changing environment. MTT Agrifood Research, Jokioinen, Finland, 2008.

BENATTO, A.; SOUZA, M. T., SOUZA, M. T.; MÓGOR, A. F.; PIMENTEL, I. C.; ZAWADNEAK, M. A. C. Sampling methods and meteorological factors on pests and beneficial organisms in strawberries. **EntomoBrasilis**, v. 14, e926, 2021.

BENICÁ, P. C.; ATAIDE, J. O.; FRAGOSO, D F. M.; PRATISSOLI, D. Controle da lagarta do morangueiro pelo bioinseticida *Bacillus thuringiensis*. In. Anais da 30ª Semana Acadêmica do Curso de Agronomia do CCA/UFES-SEAGRO, 28º, 2017, Alegre. **Anais...** Alegre: UFES – SEAGRO, 2017, p. 1-4.

BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA, D. E.; ZAWADNEAK, M. A. C. **Guia para identificação e monitoramento de pragas e seus inimigos naturais em morangueiro.** Brasília: Embrapa, 2015, 46p.

BETHKE, J. A.; VANDER MEY, B. Pest alert: *Duponchelia fovealis*. **University of California Cooperative Extension San Diego.** San Diego, 2010.

BONSIGNORE, C. P.; VACANTE, V. *Duponchelia fovealis* (Zeller). A new emergency for Strawberry? **Protezione delle colture**, Reggio Calabria, v. 3, p. 40-43, 2010.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida. **FDACS - Division of Plant Industry**, Florida, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos e Alimentos.** 2016. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos> > Consultado em: 05 de jun de 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes da Área Vegetal, 2019.** Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pncrc-vegetal/arquivos/21-portaria-no>

267-de-11-de-dezembro-de-2019-publicacao-de-resultados-2015-a-2018.pdf >. Consultado em: 07 Jun 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - **Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins** (AGROFIT). Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Consultado em: 15 mai 2021

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio\\_nacional\\_vigilancia\\_pop\\_populac\\_expostas\\_agrotoxicos.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_pop_populac_expostas_agrotoxicos.pdf)>. Consultado em: 05 jun 2021

CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International). Selected sections for: *Duponchelia fovealis* (southern European marshland pyralid). Crop Protection Compendium. **Invasive Species Compendium** (Beta). Disponível em: < <https://www.cabi.org/what-we-do/invasive-species/>> Consultado em: 02 jun 2021.

CARVALHO, S.P. Histórico e evolução da cultura do morangueiro no Brasil nos últimos 50 anos. **Revista de Horticultura Brasileira**, Viçosa, v. 29, n. 2, CD-ROM, 2011

CRUZ-ESTEBAN, S.; ROJAS, J.C. Pheromone-Baited Traps Confirm the Presence of *Duponchelia fovealis* in Strawberry Crops in Mexico. **Southwestern Entomologist**, Michoacán, v. 46, n. 2, p. 533-536, 2021.

EFIL, L.; ÖZGÜR, O.; EFIL, F. A new pest, *Duponchelia fovealis* Zeller, on strawberries in Turkey: damage, distribution and parasitoid. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, Bingöl, v. 2, p. 328-334, 2014

EILENBERG, J. A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biological Control**, Frederiksberg, v. 46, p. 387-400, 2001.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMITIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 109-120, 2011.

FRANK, S. D.; NAGLE, A. M. Impact of selected insecticides against European pepper moth larvae infesting poinsettia, 2021. **Arthropod Management Tests**, Raleigh, v. 46, n. 1, p. tsab104, 2021.

GONÇALVES, R. B.; OLIVEIRA, M. C. H.; BACH, R. P.; PIMENTEL, I. C.; ZAWADNEAK, M. A. C. Estratégias sustentáveis e ambientalmente seguras no controle de *Duponchelia fovealis* sob a ótica da bibliometria. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO, VI, 2021, Lages. **Anais...** Lages: Uniplac, 2021.

HAJEK, A. E.; DELALIBERA JR, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **Biological Control**, Ithaca, v. 55, p. 147-158, 2010.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop protection**, v. 19, n. 8, p.603-608, 2000.

MADAIL, J. C. M. Panorama econômico. pp 15-33. IN: ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, J.; SCHWENGBER, J. E. (Editores Técnicos). **Morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 589 p.

MESSELINK, G.; WENSWEEN, W. V. Biocontrol of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Pyralidae) with soil-dwelling predators in potted plants. **Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences**, Naaldwijk, v. 68, n. 4Pt. A, p. 159-165, 2003.

MEY, B. V.; BETHKE, J. A. Efficacy of selected insecticides against the European pepper moth, *Duponchelia fovealis*, on verbena grown outdoors, 2010. **Arthropod Management Tests**, San Diego, v. 36, n. 1, p. G. 22, 2011.

MYERS, J. H.; CORY, J. S. **Biological Control Agents: Invasive Species or Valuable Solutions?** In: Impact of Biological Invasions on Ecosystem Services. Springer International Publishing, p. 191-202. 2017.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Morango: Uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Journal of Chromatographic Science**, Campinas, v. 4, n. 1, p. 52–76, 2012.

PAES, J. P. P.; LIMA, V. L. S.; PRATISSOLI, D.; CARVALHO, J. R.; BUENO, R. C. O. F. Selection of parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and parasitism at different egg ages of *Duponchelia*

*fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Canoinhas, v. 40, p. e-42216-s42216, 2018a.

PAES, J. P. P.; LIMA, V. L. S.; CARVALHO, J. R.; PRATISSOLI, D. Functional responses of two egg parasitoids of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) genre on *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) eggs. **Journal of Experimental Agriculture International**, Canoinhas, v. 20, n. 6, p. 1-7, 2018b.

PARANÁ - SEAB. Secretaria de Agricultura e do Abastecimento. **Produção de Morango se destaca na região de Curitiba e cresce no Paraná. 2021.** Disponível em < <https://www.agricultura.pr.gov.br/Noticia/Producao-de-morango-se-destaca-na-regiao-de-Curitiba-e-cresce-no-Parana#>>. Consultado em: Jun de 2021.

PARABÁ - SEAB. Secretaria de Agricultura e do Abastecimento. **DERAL – PROGNÓSTICO FRUTICULTURA - 2019.** Disponível em < <https://www.agricultura.pr.gov.br/Pagina/Frusicultura-48> >. Consultado em: Jun de 2021.

PARANÁ - SESA. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. **Plano de vigilância e atenção à saúde de populações expostas aos agrotóxicos do Estado do Paraná. 2019.** Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Saude-e-agrotoxicos>>. Consultado em 07 jun 2021.

PARRA, J. R. P. Controle Biológico na agricultura Brasileira. **Entomological Communications**, Piracicaba, v. 1, ec01002, 2019.

PARRA, J. R. P.; JUNIOR, A. C. Applied Biological Control in Brazil: From Laboratory Assays to Field Application. **Journal of Insect Science**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 5, 2019.

PIROVANI, V. D. **Método de manejo para *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) na cultura do morangueiro.** 113f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

PIROVANI, V. D.; PRATISSOLI, D.; TIBÚRCIO, M. O.; CARVALHO, J. R.; DAMASCENA, A. P.; FARIA, L. V. *Trichogramma galloi* and *Trichogramma pretiosum* for the management of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera:

Crambidae) in strawberry plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Alegre, v. 52, n. 8, p. 690-693, 2017.

POITEVIN, G.C.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, Curitiba, v. 53(3), p. 323-331, 2018.

RODRIGUES, R.; JARAS, L. I.; POLTRONIERI, A. S.; PIMENTEL, I. C.; ZAWADNEAK, M. A. C. Seletividade de inseticidas reguladores de crescimento e botânico no parasitismo de três espécies de *Trichogramma* em ovo de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Entomobrasilis**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 26-32, 2017.

RUSCH, A.; BOMMARCO, R.; EKBOM, B. Conservation Biological Control in Agricultural Landscapes. **Advances in Botanical Research**, Villenave d'Ornon, v. 81, p. 333-360, 2017.

SALOMÃO, K. P. O. S. **Extratos vegetais e *Bacillus thuringiensis* visando o manejo de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae)**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.

SANTOS, F. M. **Toxicidade de inseticidas para *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae) e potencial parasitismo por *Cortesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae)**. 61f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, 2014.

SANTOS, F. M.; CARVALHO, J. R.; PRATISSOLI, D.; BUENO, R. C. O. F.; PIROVANI, V. D.; RODRIGUES, H. S. Toxicity of insecticides in *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a new strawberry pest in Brazil under laboratory conditions. **Journal of Experimental Agriculture International**, Recife, v. 35, n. 5, p. 1-7, 2019.

SOUZA, M. T.; ZAWADNEAK, M. A. C. Monitorando e aprendendo o manejo das pragas do morangueiro. **Campo & Negócios Hortifrutí**, v. 05, p. 58-61, 2018.

STOCKS, S.D.; HODGES, A. **European pepper moth or Southern European marsh pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller)**, 2012. Disponível em

<<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN91000.pdf>> Consultado em: 14 jun de 2021.

STUART, A. K. C.; FURUIE, J. L.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Increased mortality of the European Pepper Moth *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) using entomopathogenic fungi consortia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Curitiba, v. 177, p.107503, 2020.

TRIPATHI, A.K.; UPADHYAY, S.; BHUIYAN, M.; BHATTACHARYA, P.R.A. Review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, New Delhi, v. 1, n. 5, p.52-63, 2009.

VALADARES-INGLIS, M. C.; LOPES, R. B.; FARIA, M. R. Controle de atropodes-praga com fungos entomopatogênicos. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020, p. 201-236.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **Biological Control**, Wageningen, v. 57, p. 1-20, 2012.

VANDENDRIESSCHE T.; KEULEMANS J.; GEERAERD A.; NICOLAI B. M.; HERTOOG M. L. A. T. M. Evaluation of fast volatile analysis for detection of *Botrytis cinerea* infections in strawberry. **Food Microbiology**, Leuven, v. 36, n. 1, p. 406-414, 2012.

WAQUIL, J. M. Manejo Integrado de pragas: revisão histórica e perspectivas. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo [resumos expandidos]. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo; Florianópolis: Epagri, 2002.

ZAKER M. Antifungal evaluation of some plant extracts in controlling *Fusarium solani*, the causal agent of potato dry rot *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Agriculture and Biosciences**, Shahrood, v. 3, n. 4, p. 190-195, 2014

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; KUHN, T. A.; ARAUJO, E.; DOLCI, E.; SANTOS, B.; SILVA, C.; BENATTO, A.; VIDAL, H. Novo Desafio. **Cultivar HF** · agosto / setembro, Curitiba, p. 31-32, 2011.

ZAWADNEAK, M. A. C.; BOTTON, M.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; VIDAL, H. R.; BERNARDI, D. **Pragas do morangueiro**, in: ZAWADNEAK, M. A. C.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, Á.F. (Eds.), Como produzir morangos 2<sup>a</sup>. ed. Ed. UFPR, Curitiba, 296p, 2018.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; PIMENTEL, I. C.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B., POLTRONIERI, A. S.; SOLIS, M. A. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, Curitiba, V. 34, n. 3, p. 91–95, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C.; REINHART, V.; DA ROSA, J. M.; DE SOUZA, M. T.; DE SOUZA, M. T. **Manejo integrado de pragas do morangueiro. Caderno de Campo**. CURITIBA: SENAR AR/PR, 124p., 2020.

ZAWADNEAK, M. A. C.; VIDAL H. R.; SANTOS B. **Lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller**. In: Vilela, E. F., R. A Zucchi. (ed). Pragas Introduzidas no Brasil, insetos e ácaros, FEALQ, Piracicaba, Brasil, 2015.



# 4 CAPÍTULO II

FORMAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS PARA CONTROLE DE  
*Duponchelia fovealis*.

#### 4.1 ARTIGO II - INCREASED MORTALITY OF THE EUROPEAN PEPPER MOTH *DUPONCHELIA FOVEALIS* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) USING ENTOMOPATHOGENIC FUNGAL CONSORTIA

PUBLISHED AT *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY* (2020)

##### RESUMO

A lagarta da coroa *Duponchelia fovealis* é uma praga invasiva que afeta diversas culturas ao redor do mundo. Devido ao seu hábito críptico, seu controle torna-se dificultado, promovendo o uso indiscriminado de inseticidas químicos, nocivos ao meio ambiente e ao ser humano. Assim sendo, a maneira mais eficaz para controle desta praga é a utilização de fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico. Este trabalho traz uma nova abordagem no campo do controle biológico, fazendo uso combinado desse grupo de fungos, como um consórcio, visando obter aumento na mortalidade de *D. fovealis*. Para isto, foi testada a compatibilidade de cinco diferentes linhagens de *Beauveria bassiana*, *Purpureocillium lilacinum* e *Isaria javanica*, com o objetivo de avaliar a viabilidade da associação destas linhagens para formação de consórcios. Em seguida, foi avaliado o potencial inseticida de cada consórcio, bem como das linhagens separadamente, para verificar possível aumento na mortalidade. A presença de enzimas líticas envolvidas no controle biológico, como quitinase, celulase, protease e lipase, também foi investigada. Dos dez consórcios obtidos, sete foram capazes de promover um aumento na mortalidade de *D. fovealis* e o aumento observado foi associado à presença de enzimas líticas. Um consórcio formado por duas linhagens de *B. bassiana* foi o que apresentou melhor desempenho, apresentando um aumento de 17% no controle da praga comparado aos fungos aplicados separadamente. O uso de consórcios de fungos entomopatogênicos é uma alternativa promissora e sustentável ao uso de inseticidas químicos.

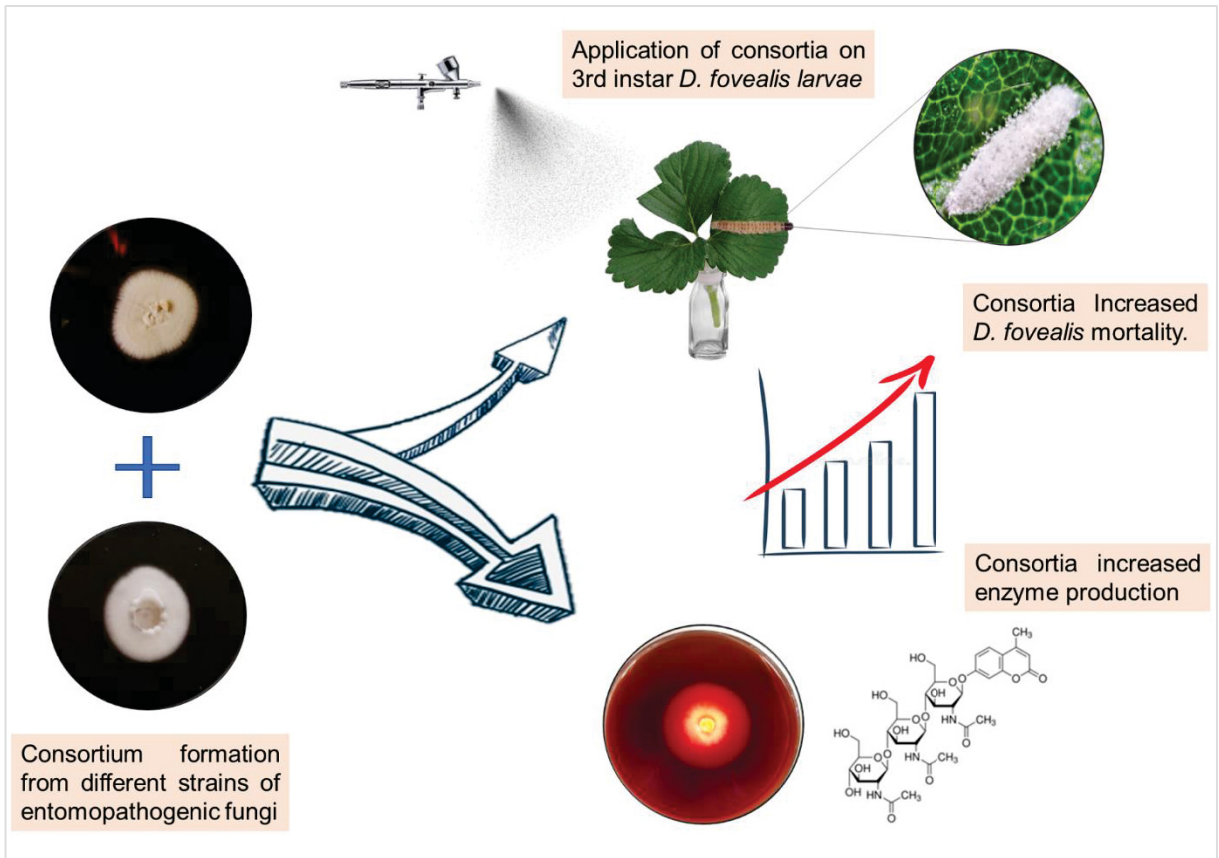
Palavras-chave: *Duponchelia fovealis*; *Beauveria bassiana*; Controle biológico; Consórcio microbiano

## ABSTRACT

The European pepper moth (*Duponchelia fovealis*) is an invasive pest affecting crops in many countries. The use of chemicals to control *D. fovealis* is not only ineffective but is hazardous to the environment. The most effective way to reduce this invasive species is biological control using entomopathogenic fungi. Furthermore, the use of combining entomopathogenic fungi is a novel and underexplored approach in the field of biocontrol research. The compatibility of different strains of *Beauveria bassiana*, *Purpureocillium lilacinum*, and *Isaria javanica* was evaluated by forming two-fungi consortia. The pathogenicity of these consortia against *D. fovealis*, as well as the related enzymatic activities, were investigated. Seven consortia increased *D. fovealis* mortality, showing synergistic activity. One consortium formed by two strains of *B. bassiana* produced highest control. Moreover, these consortia also demonstrated increased chitinase and lipase activities. Higher mortality of *D. fovealis* by these consortia was mainly associated with enzyme production. One consortium, also formed by two strains of *B. bassiana*, was unique in producing lower *D. fovealis* mortality than the two strains alone. The potential use of entomopathogenic fungal consortia is a promising alternative approach for biological control. Most of the consortia used in this study improved control of *D. fovealis*, showed synergistic activity and could be a suitable strategy to control this pest.

Keywords: *Duponchelia fovealis*; *Beauveria bassiana*; Biological control; Microbial consortium.

### GRAPHICAL ABSTRACT



## 1 INTRODUCTION

The European pepper moth *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) is native to the eastern Mediterranean region and, while it occurs mostly in the European countries, it also occurs in Asia, Africa, North America, and, most recently, in South America (BARDET, 2008; BONSIGNORE e VACANTE, 2010; EFIL et al., 2014; ZAWADNEAK et al., 2016). *D. fovealis* is a polyphagous insect with a host range of more than 70 different plant species, including horticultural and ornamental plants. Examples are pepper (*Capsicum annuum*), beetroot (*Beta vulgaris*), basil (*Ocimum basilicum*), mulberry (*Rubus fruticosus*), tomato (*Solanum lycopersicum*), maize (*Zea mays*), strawberry (*Fragaria x ananassa*), azalea (*Rhododendron* spp.), begonia (*Begonia* spp.), and orchid (*Phalaenopsis* spp.) (BRAMBILA e STOCKS, 2010; STOCKS e HODGES, 2012). The infected plants present stained, perforated, wilted and pale leaves, with low productivity, and even premature death. Furthermore, the study by Stocks and Hodges, (2012) and Zawadneak et al., (2016) showed that the damage of only strawberry cultures in the U.S. causes significant economic losses of about US\$300 million per year. The cryptic habit of *D. fovealis* reduces the success of any single pest control approach. Moreover, this widely distributed pest attacks crops in countries with different climates, such as the USA and Canada, Brazil (BRAMBILA e STOCKS, 2010; ZAWADNEAK et al., 2016), Belgium (FAQUAET, 2000), and Turkey (EFIL et al., 2011). Its adaptability, not only in different feeding habits but different environmental conditions, aggravates the damage (PAES et al., 2018). Excessive application of pesticides harms the environment and induces pesticide resistance, which in turn affects beneficial biota and impairs consumer health (VAN LENTEREN, 2012).

Biocontrol of *D. fovealis* using entomopathogenic fungi is the most promising approach and has been successfully applied in different scenarios. These fungi produce enzymes that induce cell lysis by acting on the insect cuticle, promoting fungal penetration and colonization of the hemolymph that result in host death (SOUZA et al., 2004; PELL et al., 2010, ALAMRI et al., 2016; SARAVANAKUMAR et al., 2016).

Multiple studies are being performed to show the association of different strains of microorganisms, which may promote increased success in environmentally friendly biocontrol of plant pathogens (SANTHANAM et al., 2015; SHARMA et al., 2018; SANTHANAM et al., 2019). Some of these studies also showed that bacterial

and fungal consortia release extracellular enzymes and that these increased enzymatic activities can potentially improve success of the pathogens in biocontrol programs (FUENTES et al., 2016; SHARMA et al., 2018).

Few studies have been published that demonstrate the potential of entomopathogenic microbial consortia in increase the insect mortality. In this study five entomopathogenic fungi strains of species that were previously described for control of *D. fovealis* (AMATUZZI et al., 2018; POITEVIN et al., 2018) were selected to create ten different consortia. Enzyme production and ability to increase mortality of *D. fovealis* were evaluated.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 FUNGAL INOCULA

Three isolates of *Beauveria bassiana* (Bea 111, Bov 2 and Bov 3), one from *Isaria javanica* (Isa 340), and one from *Purpureocillium lilacinum* species (Pae 69), all deposited at the Paraná State Microbiological Collection Network—TAXONline (CMRP), Curitiba, Brazil, were used in our experiments (CHART 1).

CHART 1 – ENTOMOPATHOGENIC FUNGI STRAINS TESTED AGAINST *Duponchelia fovealis*.

Strains	Internal ID	CMRP ID	Genbank ID	Source
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Pae 69	-	KF255399	Soy endophyte
<i>Isaria javanica</i>	Isa 340	2029	KY488507	Soil
<i>Beauveria bassiana</i>	Bea 111	2025	KY471653	Soil
<i>Beauveria bassiana</i>	Bov 3	2016	KY751848	Coleoptera
<i>Beauveria bassiana</i>	Bov 2	2015	KU751847	Coleoptera

SOURCE: The author (2021)

LEGEND: CMRP – Coleção Microbiológica da Rede Paranaense.

Single-spore fungal isolates were cultured on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) in Petri dishes for 14 days at 28 °C, 24 h dark. Following culture, mycelia and conidia were scraped from media and transferred to a 0.85% saline solution (NaCl containing 0.01% Tween 80®). The culture suspensions were stirred and filtered with a lint fabric. A Neubauer chamber was used to estimate the conidia concentration. The solution was diluted to  $1 \times 10^7$  conidia mL<sup>-1</sup> for further use (WANG et al., 2017).

### 2.2 FUNGAL COMPATIBILITY

Although some well-known fungi, including *Beauveria* sp., *Isaria* sp., and *Purpureocillium* sp. are entomopathogens, certain species have been reported as mycoparasites (KAVKOVÁ et al., 2005; SZENTIVÁNYI et al., 2006; ETHUR et al., 2014; BEOM et al., 2018). To evaluate compatibility among the isolates obtained for this study, an *in vitro* host-range assay was carried out (KRAUSS et al., 1998; KRAUS et al., 2004). Initially, the fungi cultures were grown on potato dextrose agar (PDA) medium at 28 °C for 14 days. Then, a 6-mm plug containing the inoculum was inverted and placed on the surface of the host colony without contact with the underlying agar,

i.e., food base. An overgrowth of the inoculum over the mycelium of host fungi indicated the presence of mycoparasitism. The growth percentage was calculated by the distance of the inoculum margin from the plug divided by the days post-inoculation. The experiment was conducted in three replicates, and the analysis of variance (ANOVA) was used to compare the mean. The potential for mycoparasitism of the entomopathogenic fungi used in this study were tested against each of the other species/strains.

## 2.3 INDIVIDUAL ENZYME ASSAYS

A variety of fungal extracellular enzymes degrade the host insect cuticle and tissues in various ways. Chitinases, proteases, lipases and cellulases are some of the most important ones and are responsible for the cuticle degradation and penetrations by mechanical pressure (VALADARES-INGLIS, LOPES, FARIA, 2020). Following Kleiner et al. (2010), the agar plate assay method was used to determine the presence of chitinase, cellulase, protease, and lipase. As mentioned, the fungal isolates were cultured in SDA, and inoculum containing the isolate's mycelia was placed at the center of the Petri dish with specific enzyme media and incubated for three days. The presence of a halo around the colony confirmed the presence of enzyme activity.

### 2.3.1 Preparation of chitinase medium

Colloidal chitin was prepared as previously described by Roberts and Selitrennikoff (1988). Chitin flakes (5 g) (Whiga chemicals, Shanghai) were added slowly to cold concentrated hydrochloric acid (60 mL) and placed on a magnetic stirrer to agitate overnight at 4 °C. A dense precipitate was formed, and cold ethanol (200 mL) was added and then incubated overnight at 26 °C. The resulting chitin suspension was centrifuged at 3,000 rpm for 20 min at 4 °C. The precipitate was then washed repeatedly with cold distilled water until the pH reached near to 5.5. The supernatant was discarded, and colloidal chitin was used as a substrate to determine the presence of chitinase in a medium containing (g.L<sup>-1</sup>): colloidal chitin 15; yeast extract 0.5; ammonium sulfate 1; magnesium sulfate hexahydrate 0.3; monopotassium phosphate 1.36; agar 15 (GUPTA et al., 1995). After staining with 10 mL of a 1% iodine solution, the zones of clearance around the fungal colony indicated chitin hydrolysis.



### 2.3.2 Preparation of cellulase medium

The presence of cellulase was determined using a basal medium to evaluate cellulase presence containing (g.L<sup>-1</sup>): carboxymethylcellulose 10; yeast extract 0.5; dextrose 10; magnesium sulfate hexahydrate 2; agar 15; calcium chloride 1 M 100 µL of a standard solution; M9 stock solution 200 mL. After 3 days of growth, 10 mL of Congo Red was poured into the Petri dishes for 15 min. Then, the dishes were washed with sodium chloride (5 M) solution (TEATHER e WOOD, 1982). Clear zones around the fungal colony indicated cellulase activity.

### 2.3.3 Preparation of protease medium

The presence of protease was evaluated using basal medium containing (g L<sup>-1</sup>): yeast extract 2.5; dextrose 1; sodium chloride 2.5; agar 15; tryptone 5; skimmed milk 100 mL. Clear zones around the fungal colony indicated the presence of protease activity. This method evaluates the proteolytic activity based on casein hydrolysis in which skimmed milk is used as a substrate (SALEEM and IBRAHIM, 2019).

### 2.3.4 Preparation of lipase medium

The presence of lipase was evaluated using basal medium containing (g L<sup>-1</sup>): peptone 10; sodium chloride 5; agar 15; Tween 20® 10 mL. Mat zones around the fungal colony indicated the presence of lipase activity.

## 2.4 INSECT CULTURES

Larvae were obtained from the rearing facility at Professor Angelo Moreira da Costa Lima Laboratory of Entomology/UFPR, Curitiba, Paraná State, Brazil. The larvae were fed on an artificial diet and held at 70 ±10% relative humidity, 25 ±2 °C, and 14/10-h light/dark photoperiod. The artificial diet consisted of (g.L<sup>-1</sup>) seeds of *Phaseolus vulgaris* L. carioca cultivar 65, wheat germ 50, textured soybean 25, casein, 25, beer yeast 31, bacteriological agar 20, ascorbic acid 3, sorbic acid 1.5, methylparaben nipagin 2.5, tetracycline 0.14, 30% formaldehyde 3 mL, Vanderzant vitamin mixture 8 mL, V8® vegetable juice 50 mL (ZAWADNEAK et al., 2017). The larvae were cultured to third instar when used for mortality bioassays, as described below.

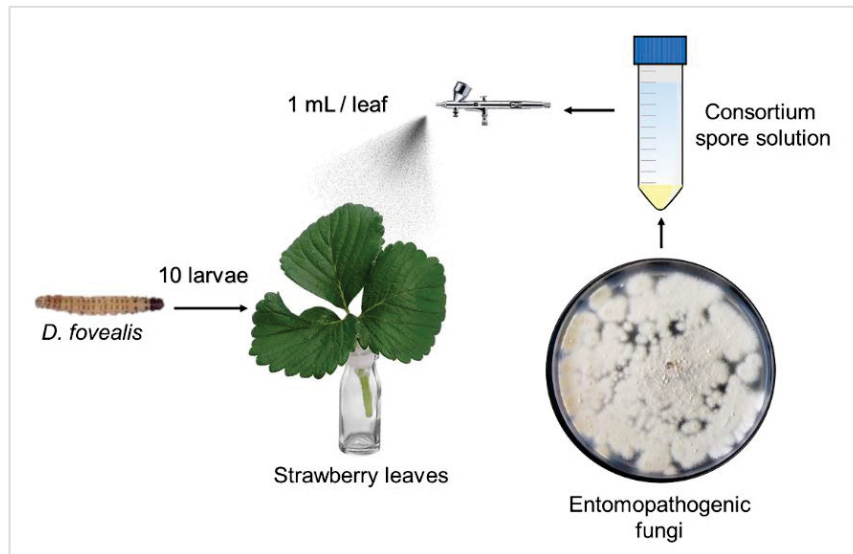
## 2.5 LABORATORY BIOASSAY WITH *Duponchelia fovealis*

Each consortium solution consisted of saline solution, Tween 80® (0.08%), and  $10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of each fungus (final concentration:  $2 \times 10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) (TABLE 1, FIGURE 1). For treatment with the individual fungal strains, the final concentration was also  $2 \times 10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . Ten third instar larvae of *D. fovealis* were placed on a strawberry leaf (food source). The leaves were sprayed with a 1-mL solution of one individual fungal strain or one consortium solution (Table 1) using an electric micro atomizer Airbrush, “VL” model, at 10 PSI (Alves, 1998). Strawberry leaves were incubated for 7 days at  $25 \pm 2$  °C, relative humidity:  $70 \pm 10\%$ , 14/10-h light/dark photoperiod. Dead larvae were removed on the seventh day and held in a Biological Oxygen Demand (BOD) incubator until extrusion of fungi. Thirty replicates consisting of 10 larvae each were used for every treatment. These replicates were divided in three trials (10 replicates per trial) that were conducted separately. The Scott-Knott analysis of variance was used to compare the results. The experimental design was completely randomized.

TABLE 1 - TEN CONSORTIA, EACH FORMED BY TWO DIFFERENT ENTOMOPATHOGENIC STRAINS.

Consortia	Isolate 1*	Isolate 2*
Cons 1	Pae 69	Isa 340
Cons 2	Pae 69	Bea 111
Cons 3	Pae 69	Bov 2
Cons 4	Pae 69	Bov 3
Cons 5	Isa 340	Bea 111
Cons 6	Isa 340	Bov 2
Cons 7	Isa 340	Bov 3
Cons 8	Bea 111	Bov 2
Cons 9	Bea 111	Bov 3
Cons 10	Bov 2	Bov 3

SOURCE: The author (2021)

FIGURE 1 - SCHEME OF LABORATORY BIOASSAY WITH *Duponchelia fovealis* LARVAE

SOURCE: The author (2020)

## 2.6 ENZYME ASSAY OF THE CONSORTIA

Once the consortia were formed, enzymatic tests were performed to evaluate the interference of dual fungal culture on enzyme activity. SDA medium was used to culture the fungal isolates for 7 days at 28 °C and 12/12-h light/dark photoperiod. Conidia solutions containing both fungi of each consortium in a final concentration of  $2 \times 10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>, were prepared. Then, 10 µL of one consortium solution was placed at the center of each Petri dish with specific enzyme media (as described above) and incubated for 3 days. The presence of a halo around the colony indicated the enzyme activity.

### 3 RESULTS

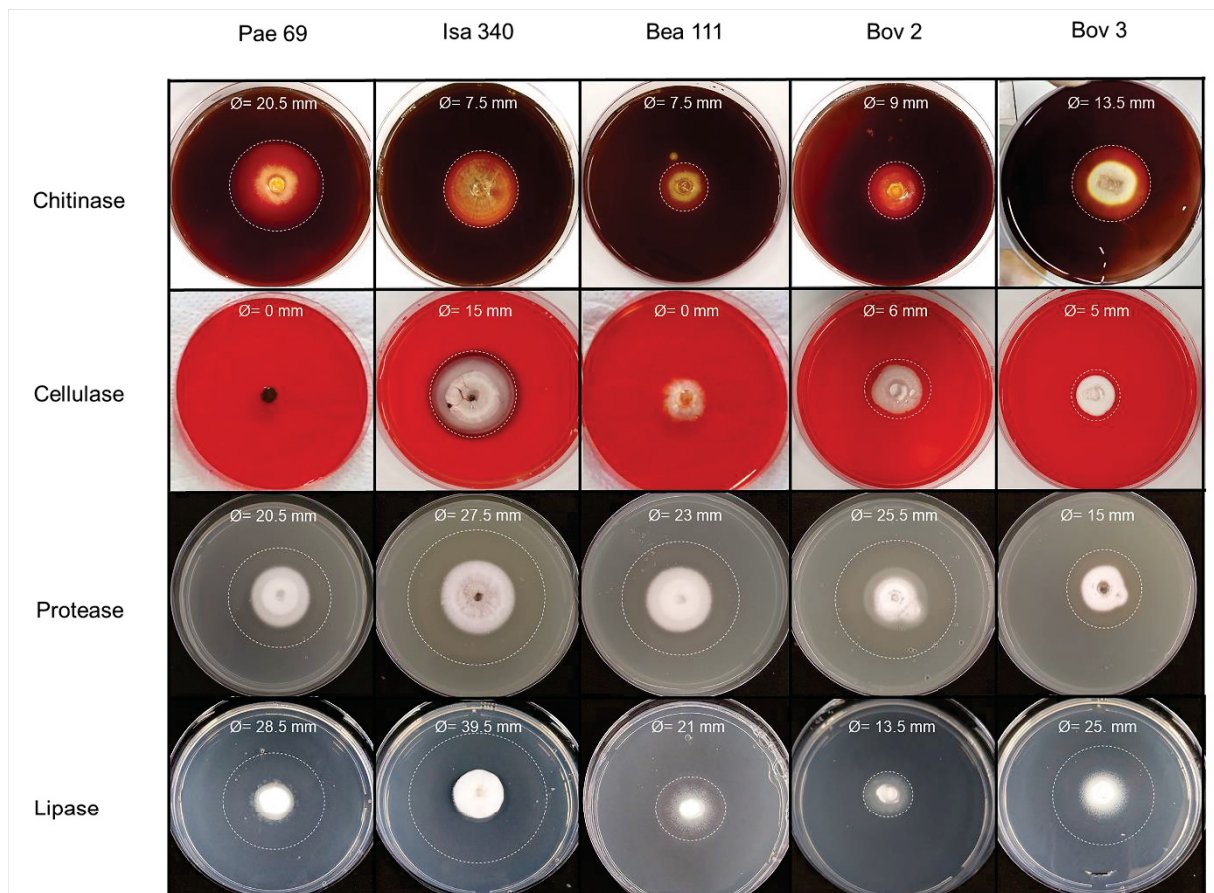
#### 3.1 FUNGAL COMPATIBILITY

None of the five isolates showed evidence of mycoparasitism, indicating the possibility of co-culturing to form the different fungal consortia that were later used in testing against *D. fovealis*.

#### 3.2 ENZYME ASSAYS OF INDIVIDUAL FUNGI

The chitinase, cellulase, protease, and lipase activities of fungal isolates were evaluated. All five isolates showed chitinase, protease, and lipase activities; however, only three isolates (Isa 340, Bov 2, and Bov 3) showed cellulase activity (FIGURE 2).

FIGURE 2 - HALO FORMATION DUE TO THE ACTIVITY OF CHITINASE, CELLULOSE, PROTEASE, AND LIPASE ENZYMES FROM THE FIVE ENTOMOPATHOGENIC ISOLATES.



SOURCE: The author (2020)

### 3.3 LABORATORY BIOASSAY WITH *Duponchelia fovealis*

After establishing compatibility of the entomopathogenic fungi, to test for the mortality of the insect, different fungal strains were employed for the formation of ten different consortia and individual strains. Differences in mortality were observed between the treatments (FIGURE 3 – TABLE 2). Seven consortia showed synergistic effects on *D. fovealis* (Figure 3 a–g).

FIGURE 3 - SYNERGISTIC ACTIVITIES OF THE TEN FUNGAL CONSORTIA THAT INCREASED *Duponchelia fovealis* MORTALITY. CONTINUE.

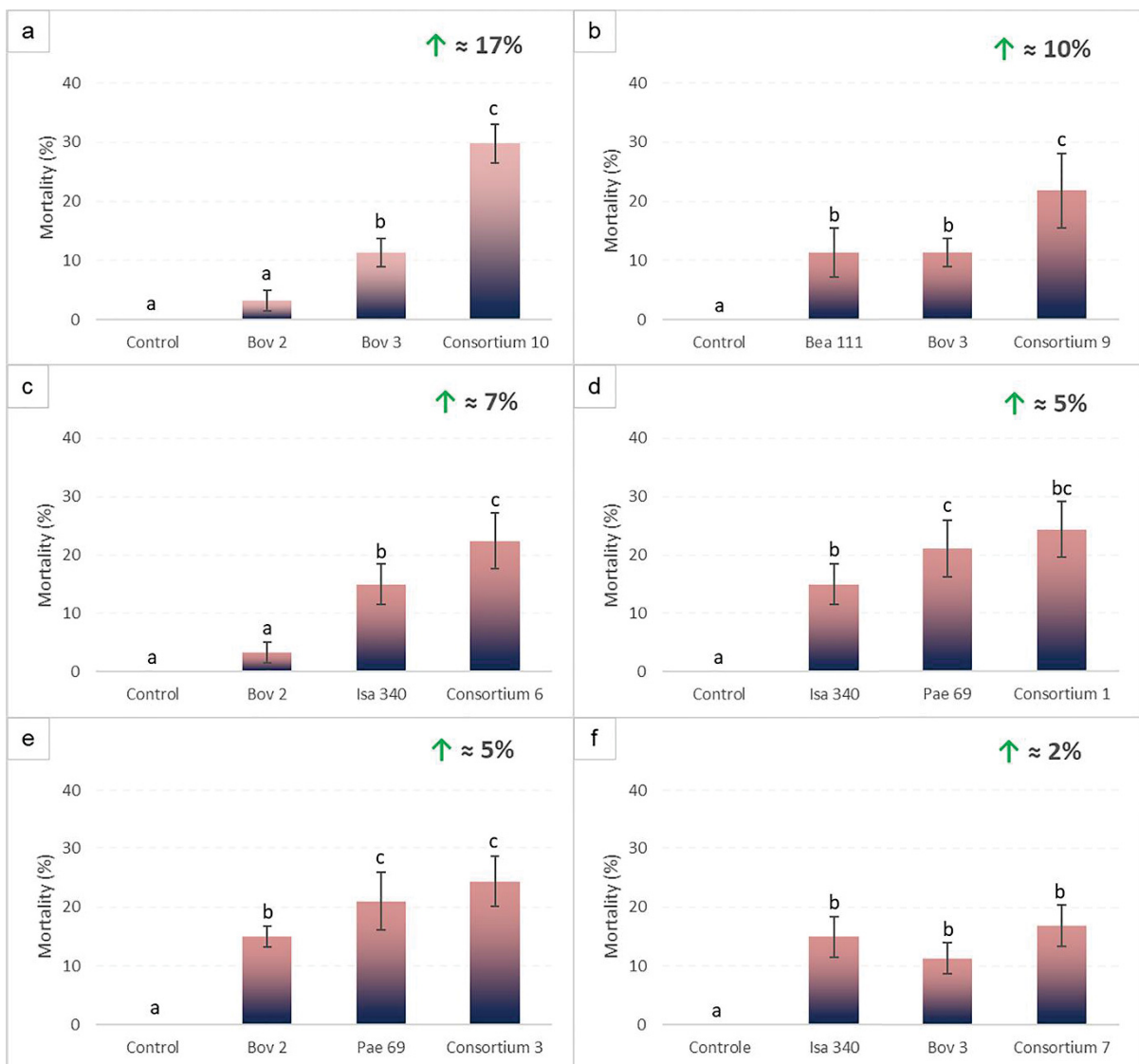
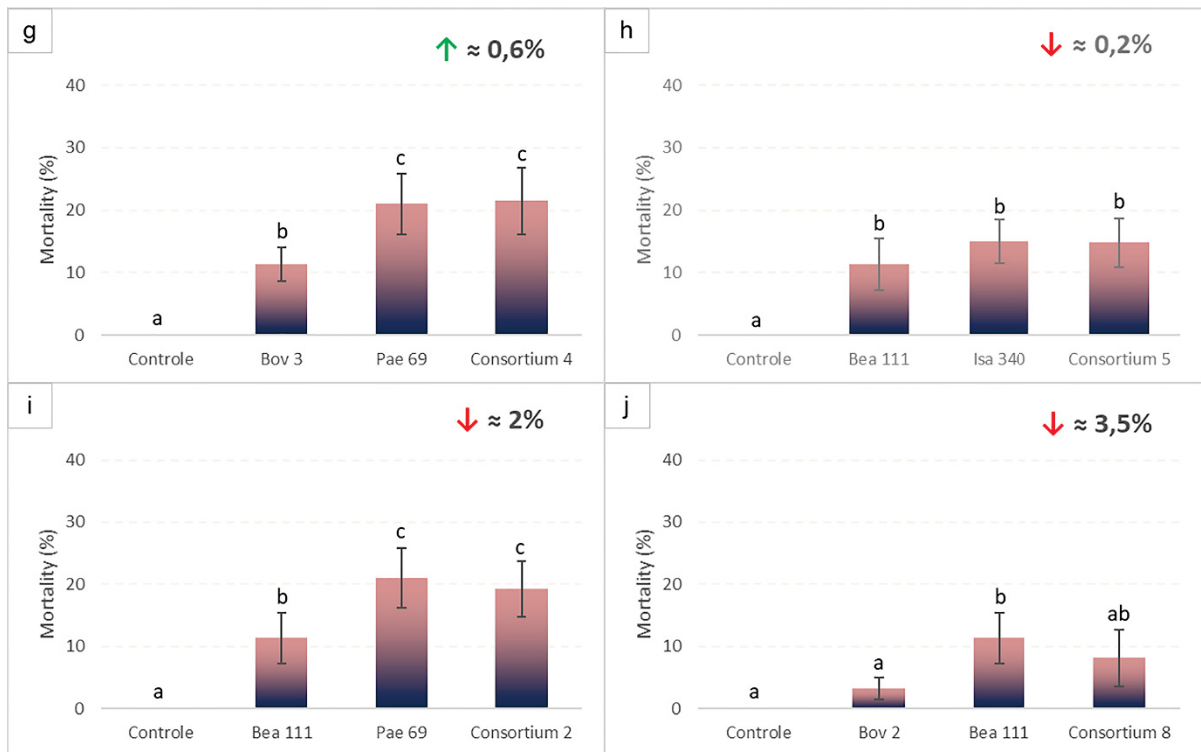


FIGURE 3 - SYNERGISTIC ACTIVITIES OF THE TEN FUNGAL CONSORTIA THAT INCREASED *Duponchelia fovealis* MORTALITY. CONCLUSION.



SOURCE: The author (2020)  
LEGEND:  $p \leq 0.05$

TABLE 2 – MORTALITY MEAN OF *Duponchelia fovealis* OF EACH STRAIN APPLIED ALONE AND THE RESPECTIVE CONSORTIUM. CONTINUE.

Treatment	Mortality mean (%)	Increased mortality (%)
Control	0	
Bov 3	11.34	10.17
Pae 69	20.99	0.52
Consortium 4	21.51	
Control	0	
Isa 340	14.96	9.39
Pae 69	20.99	3.36
Consortium 1	24.35	
Control	0	
Bov 2	3.26	11.87
Pae 69	20.99	-5.86
Consortium 3	15.13	
Control	0	
Bea 111	11.32	7.89
Pae 69	20.99	-1.78
Consortium 2	19.21	

TABLE 2 – MORTALITY MEAN OF *Duponchelia fovealis* OF EACH STRAIN APPLIED ALONE AND THE RESPECTIVE CONSORTIUM. CONCLUSION.

Treatment	Mortality mean (%)	Increased/ Reduced mortality (%)
Control	0	
Isa 340	14.96	2
Bov 3	11.34	5.62
Consortium 7	16.96	
Control	0	
Bov 2	3.26	26.48
Bov 3	11.34	18.4
Consortium 10	29.74	
Control	0	
Bov 2	3.26	19.15
Bea 111	14.96	7.45
Consortium 6	22.41	
Control	0	
Bov 2	3.26	4.84
Bea 111	11.32	-3.22
Consortium 8	8.81	
Control	0	
Bea 111	11.32	10.44
Bov 3	11.34	10.42
Consortium 9	21.76	
Control	0	
Bea 111	11.32	3.44
Isa 340	14.96	-0.2
Consortium 5	14.76	

SOURCE: The author (2020)

LEGEND: Increased mortality refers to the mortality increasing caused by the consortium compared to each strain applied alone.

Bov 2, Bov 3 and Bea 111: Strains of *Beauveria bassiana*;

Pae 69: strain of *Purpureocillium lilacinum*

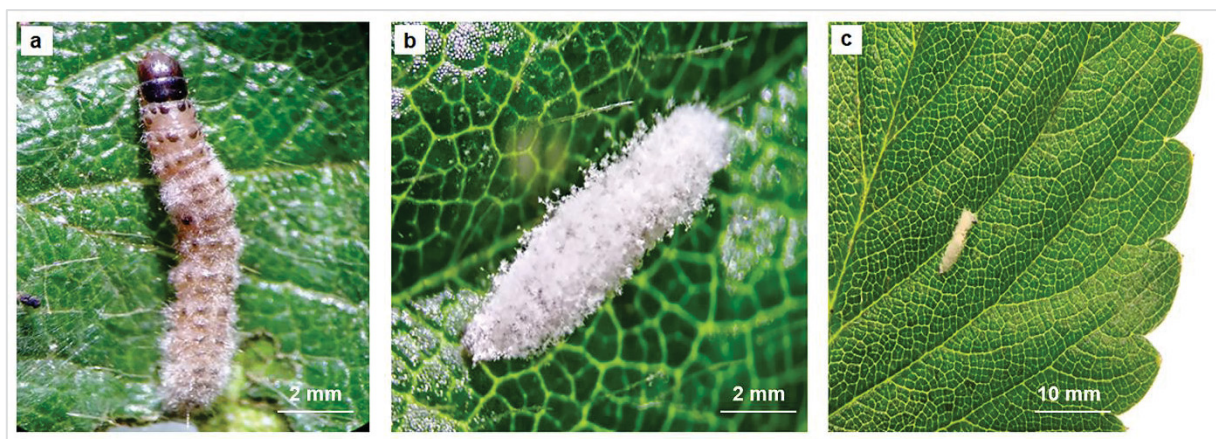
Isa340: strain of *Isaria javanica*.

The mortality results of three consortia (10, 9, and 6) (Figure 3a–c) were higher than each of the strains alone ( $p \leq 0.05$ ). However, three additional consortia (1, 7, and 4) (Figure 3d, 3f and 3g) trended to higher mortality. The highest mortality, 30%, was produced by Consortium 10 (*Beauveria* strains Bov 2 and Bov 3), 18% higher larval mortality than Bov 3 and 26% higher than Bov 2 applied individually (Figure 3a). This was followed by Consortium 9 at about 10% increased mortality compared to the isolates applied alone (Figure 3b), and Consortium 6, which produced 7% increased

larvae mortality compared to Isa 340 and 19% higher than Bov 2 applied alone (Figure 3c).

An increase of 3%, 2%, and 0.5% in mortality was shown by Consortia 1, Consortium 7, and Consortium 4, respectively, although, these results were not statistically different. Mortality was lower for Consortia 3, 5, 2, and 8 (Figure 3e, 3h–j), demonstrating the importance of testing different strains against the insect of interest, as every fungal strain behaves differently alone and in combination against a host. Fungal extrusion on dead *D. fovealis* larvae was observed (FIGURE 4).

FIGURE 4 - THIRD INSTAR LARVAE OF *Duponchelia fovealis* WITH FUNGAL EXTRUSION.



SOURCE: The author (2020)  
 LEGEND: a) Pae 69 (*P. lilacinum*).  
 b) Bov 2 (*B. bassiana*).  
 c) Consortium 10.

### 3.4 ENZYME ACTIVITIES IN THE CONSORTIA

Five consortia that produced the highest host mortality were chosen for evaluation of enzyme activities (FIGURE 5 – TABLE 3). Consortium 10 showed increased chitinase and cellulase activity. Consortium 9 showed increased enzymatic activity of cellulase, protease, and lipase and decreased chitinase activity. Consortium 6 showed a slight increase in chitinase and lipase activities and Consortium 1 showed increased activity of lipase, and consortium 3 showed no alteration in the enzymatic activity.



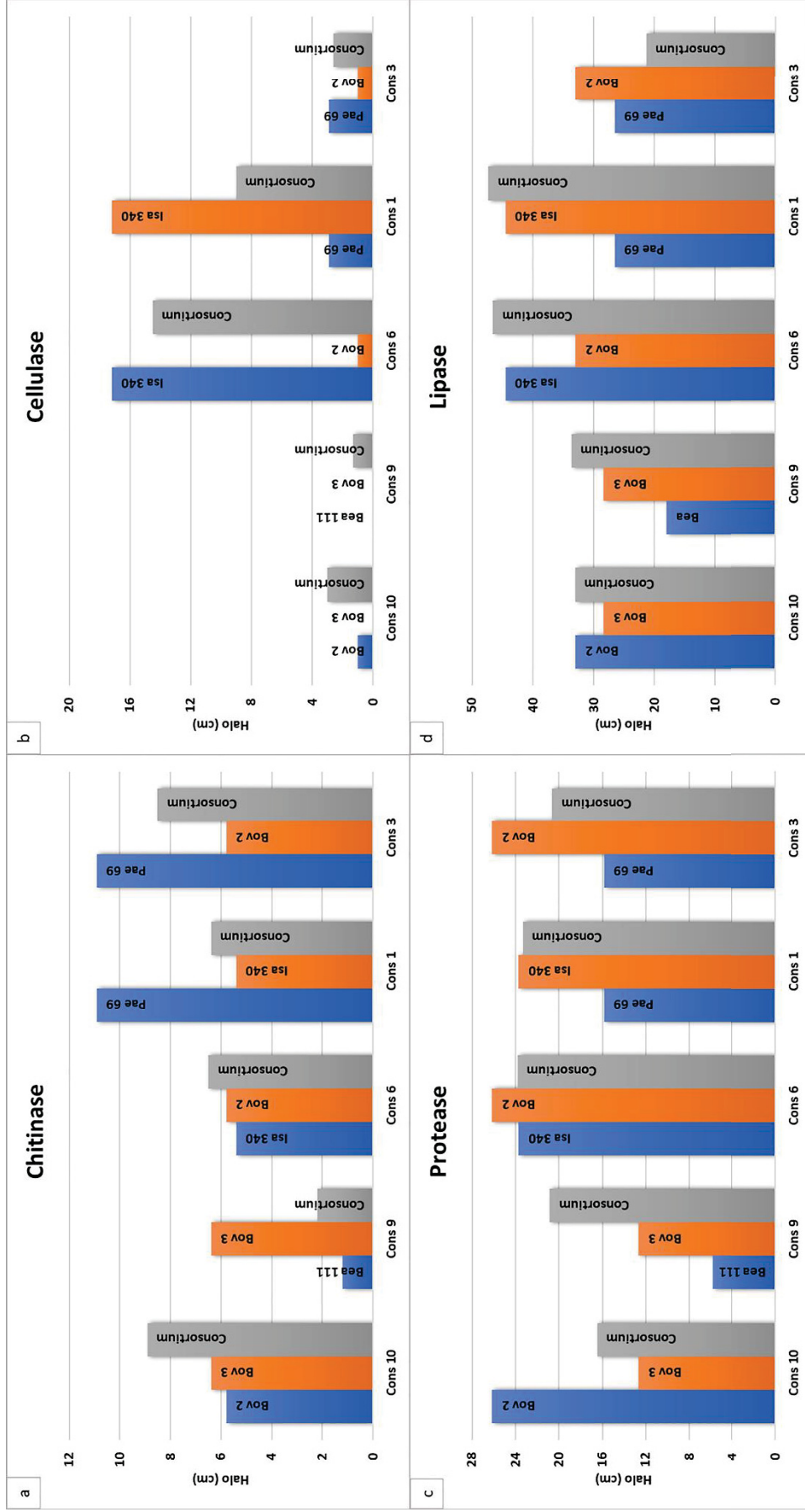
TABLE 3 – HALO SIZE OF EACH OF THE ISOLATES THAT COMPOSES THE CONSORTIA AND ITS RESPECTIVE CONSORTIUM HALO SIZE.

CHITINASE					
Strain 1	Halo mean (cm)	Strain 2	Halo mean (cm))	Consortium	Halo mean (cm)
Bov 2	5.8	Bov 3	6.4	Cons 10	8.9
Bea 111	1.2	Bov 3	6.4	Cons 9	2.2
Isa 340	5.4	Bov 2	5.8	Cons 6	6.5
Pae 69	10.9	Isa 340	5.4	Cons 1	6.4
Pae 69	10.9	Bov 2	5.8	Cons 3	8.5
CELULASE					
Strain 1	Halo mean (cm)	Strain 2	Halo mean (cm)	Consortium	Halo mean (cm)
Bov 2	1	Bov 3	0	Cons 10	3
Bea 111	0	Bov 3	0	Cons 9	1.3
Isa 340	17.2	Bov 2	1	Cons 6	14.5
Pae 69	2.9	Isa 340	17.2	Cons 1	9
Pae 69	2.9	Bov 2	1	Cons 3	2.6
PROTEASE					
Strain 1	Halo mean (cm)	Strain 2	Halo mean (cm)	Consortium	Halo mean (cm)
Bov 2	26.16	Bov 3	12.666	Cons 10	16.46
Bea 111	5.8	Bov 3	12.666	Cons 9	20.83
Isa 340	23.7	Bov 2	26.16	Cons 6	23.8
Pae 69	15.8	Isa 340	23.7	Cons 1	23.3
Pae 69	15.8	Bov 2	26.16	Cons 3	20.63
LIPASE					
Strain 1	Halo mean (cm)	Strain 2	Halo mean (cm)	Consortium	Halo mean (cm)
Bov 2	33	Bov 3	28.33	Cons 10	33
Bea 111	18.03	Bov 3	28.33	Cons 9	33.63
Isa 340	44.5	Bov 2	33	Cons 6	46.56
Pae 69	26.56	Isa 340	44.5	Cons 1	47.33
Pae 69	26.56	Bov 2	33	Cons 3	21.26

Source: The author (2020)

LEGEND: Bov 2, Bov 3 and Bea 111: Strains of *Beauveria bassiana*;  
 Pae 69: strain of *Purpureocillium lilacinum*  
 Isa340: strain of *Isaria javanica*.

FIGURE 5 - COMPARISON OF THE ENZYMES RELEASED BY ENTOMOPATHOGENIC FUNGAL STRAINS ALONE AND AS A CONSORTIA.



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: a) Chitinase.

b) Cellulase.

c) Protease.

d) Lipase.

## 4 DISCUSSION

Recent studies have shown that the application of microbial consortia may increase biological activity against a host. However, most available studies were conducted using bacteria against fungal diseases of plants. This work is, to our knowledge, the first published work to create a consortium from entomopathogenic fungi and investigate its capacity to increase mortality against *D. fovealis*. Naveeda (PhD Thesis, 2018) evaluated the ability of different entomopathogenic fungi (*Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum*, *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana*) to form a consortium and increase the mortality of some insect pests of bitter melon (*Momordica charantia*). The authors noted that the most virulent consortium was formed by *M. anisopliae* and *B. bassiana*. The consortium appeared to be more virulent than when the fungi applied individually.

In our work, five strains of three species of entomopathogenic fungi, *P. lilacinum*, *I. javanica* and *B. bassiana* were used to form ten 2-strain consortia for testing. Of the ten consortia tested, seven increased mortality of *D. fovealis* when compared to the strains applied individually (FIGURE 3) demonstrating additive or synergistic activity against *D. fovealis*. Consortium 10, consisting of *Beauveria* strains Bov 2 and Bov 3, produced the highest mortality and was more effective than the most virulent strain single tested (Pae 69 produced 21% *D. fovealis* mortality). This demonstrated an important synergism among the two strains that composed it. On the other hand, mortality produced by Consortium 8, also formed by two strains of *B. bassiana* (Bov 2 and Bea 111), was lower than that of the individual strains. This demonstrates that isolates of the same species may be also antagonistic.

Similar work using three species of microsporidia (a large group of obligatory intracellular parasites that belong to fungi kingdom), against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), was conducted by Solter et al. (2002). The main objective of the work was not to evaluate the insect mortality only, but the co-infection rates and implications in larvae development. They observed different rates of infection of each organism in co-infections, depending on the way they were applied. Besides, there were significant differences in duration of insect development, as well as larvae weight, indicating additive interactions. In some cases, it was also possible to observe antagonistic activity between the pathogens. The same group evaluated the horizontal transmission of the microsporidia consortia (PILARSKA et al., 2006). The transmission

occurred and the pattern of infection was the same as observed in the first inoculated larvae. Also, it was possible to observe the competition pattern among the microsporidia species used in the experiments. These previous works and our study, reinforces the importance of choosing appropriate strains to compose the consortium, even if they appeared (in mycoparasitism experiments) to be compatible. Furthermore, they demonstrate the importance of evaluate different parameters beyond the mortality.

Previous studies demonstrated that a consortium formed by bacteria of the same genus (*Bacillus cereus* and *B. subtilis*) produced increased mortality of *Verticillium* wilt in cotton (YANG et al., 2014). Similarly, a combination of different *Pseudomonas* strains improved mortality of *Phytophthora infestans* compared to individual strains (DE VRIEZE et al. 2018). Further, more consistent protection, compared to either of the strains applied alone, was observed. Field experiments also have been performed for plant pathogens. Higher protection against *Ralstonia*-induced wilt in tomato was observed using a consortium of eight *Pseudomonas* strains in a study by Hu et al. (2016). These studies demonstrated that similar microorganisms potentially are more effective in biocontrol when they work together.

Synergism among different biocontrol agents also was observed previously. Hussain et al. (2018) tested different treatments under greenhouse conditions using *Bacillus pulminus* INR7, *Trichoderma harzianum* and *Rhizophagus intraradices*, alone, or in combination, against the *Phaseolus vulgaris* root rot caused by *Rhizoctonia solani*. When *B. pulminus* was applied in a consortium with *R. intraradices*, disease symptoms were reduced by 51%, and symptoms were reduced by 56% when used with *T. harzianum* as 56%, about 10–15% more than *B. pulminus* applied alone. These results were due to different mortality pathways that created a synergistic effect and improved disease control. In our work, the consortium that showed the greatest improvement of *D. fovealis* control was formed by two strains of the same fungal species (*B. bassiana*). We also observed that the presence of more than one isolate can increase the production of extracellular enzymes and metabolites that are toxic to the larvae.

Entomopathogenic fungi are important candidates for development as bioinsecticides and are extensively used in biological control (BARDET, 2008). Entomopathogenic fungi produce lytic enzymes (chitinases, glucanases, cellulases, lipases, and proteases), which act by degrading the cell wall, thus killing the host. Since

chitin is the main structural component of the fungal cell wall and the insect exoskeleton, including many agricultural pests, chitinase is considered to be the most important enzyme in the biological control (SAKAI et al., 1998; CHERNIN e CHET, 2002). Proteases catalyze proteolysis and are therefore mostly involved in the initial stages of infection, solubilizing cuticle proteins, and exposing chitin to the action of chitinases. Chitinases and lipases act in the second stage of insect penetration (CHERNIN e CHET, 2002). Once inside its host, these fungi colonize the tissues, resulting in host death. All the entomopathogenic strains tested in this study produced chitinases, proteases, and lipases. Two strains did not produce cellulases (Pae 69 and Bea 111), yet showed insecticidal activity against *D. fovealis*. Microbial enzymes are gaining attention by their potential to increase pest control in integrated pest management (IMP) (BERINI et al., 2018). The production of lytic enzymes by *B. bassiana*, *I. javanica*, and *P. lilacinum* species was described previously, and their presence is linked to a more efficient and increased biocontrol ability (LEOPOLD e SAMSINÁKOVÁ, 1970; HERRERA-ESTRELLA e CHET, 1999; KHAN et al., 2003; KHAN et al., 2004; CHAN et al., 2010; BERINI et al., 2018).

To evaluate the effect of consortium formation, five most relevant consortia were tested, and increased enzyme production was evaluated in comparison to the strains alone (FIGURE 5). Consortium 10 produced the highest mortality and demonstrated increased chitinase production. This consortium also showed increased cellulase production compared to the constituent fungal strains tested alone. Consortium 9 showed increased activity for the three evaluated enzymes (cellulase, protease, and lipase). It also showed a reduction in chitinase production, which may be related to lower mortality, compared to Consortium 10 (22% and 30%, respectively). Consortium 6 showed a slight increase in chitinase and lipase activity and increased insect mortality (7%). Lastly, Consortium 1 showed increased lipase production, and an increase of 5% in host mortality.

Although the last two consortia showed a lower increase in mortality, the increase was of note, considering that they were able to promote more than 20% *D. fovealis* mortality. This may appear to be a rather weak control, but may be important if the fungal agent can survive outside its host and consistently induce a similar control. Second, in the specific case, there currently are not good control practices for this pest, so additional experiments with our consortium could improve efficacy. Our results showed that consortia producing higher mortality of *D. fovealis* also showed increased

enzyme production for at least two of the five enzymes tested, suggesting that these enzymes may be related to the observed mortality.

This is one of the first studies that used the consortia of entomopathogenic fungi to demonstrate increased mortality in an insect host and potential for use as a biological control method. We showed that different strains used to form the entomopathogenic fungi consortia are extremely important, even if they are the same species. Different results were produced by the different consortia formed of two different strains. The consortia used were promising, and careful selection of the strains is the key to success.

## REFERENCES

ALAMRI, S.; MOSTAFA, Y. S.; HASHEM, M.; ALRUMMAN, S. Enhancing the biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* JF419706 through cell wall degrading enzyme production. **International Journal of Agriculture and Biology**, Abha, v. 18, n. 4, p. 765-772, 2016.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba-SP: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz Publishers, 1988.

AMATUZZI, R. F.; POITEVIN, C. G.; POLTRONIERI, A. S.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to Soil-Borne Entomopathogenic Fungi. **Insects**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 70, 2018

ARAÚJO, J. P. M.; HUGHES, D. P. Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body? In: LOVET, B.; ST LEGER, R. J. (Eds.). **Advances in Genetics – Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic fungi**. Vol. 94. Pennsylvania: Academic Press, 2016, p.1–39.

BARDET, A. Main phytosanitary problems on strawberry in France. COST863 WG2 and WG3 Joint SGM, in: **Plant health in changing environment**. Jokioinen: MTT Agrifood Research, 2008. pp. 13.

BERINI, F.; KATZ, C.; GRUZDEV, N.; CASARTELLI, M.; TETTAMANTI, G.; MARIANELLI, F. Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances**, Varese, v. 36, n. 3, p. 818-838, 2018.

BONSIGNORE, C. P.; VACANTE, V. *Duponchelia fovealis* (Zeller). A new emergency for Strawberry? **Protezione delle colture**, Reggio Calabria, v. 3, p. 40-43, 2010.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida. **FDACS - Division of Plant Industry**, Florida, 2010. Disponível em: <[http://www.freshfromflorida.com/pi/pest\\_alerts/pdf/duponchelia\\_fovealis.pdf](http://www.freshfromflorida.com/pi/pest_alerts/pdf/duponchelia_fovealis.pdf)> Consultado em: 12 de ago de 2016

CHAN, Y-L.; CAI, D.; TAYLOR, P. W. J.; CHAN, M-T.; YEH, K. W. Adverse effect of the chitinolytic enzyme PjCHI-1 in transgenic tomato on egg mass production and embryo development of *Meloidogyne incognita*. **Plant Pathology**, Taipei, v. 59, p. 922-930, 2010.

CHERNIN, L.; CHET, I. Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. In: BURNS, R. G.; DICK, R. P. **Enzymes in the environment**. New York: CRC Press, 2002. p179-234.

DE VRIEZE, M.; GERMANIER, F.; VUILLE, N.; WEISSKOPF, L. Combining different potato-associated *Pseudomonas* strains for improved biocontrol of *Phytophthora infestans*. **Frontiers in Microbiology**, Fribourg, v. 9, ID. 2573, 2018.

EFIL, L.; EFIL, F.; ATAY, E. New pest *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) in Peanut field. **Journal of Applied Biological Science**, Adana, v. 5, n. 3, p. 65-67, 2011.

EFIL L., ÖZGÜR O., EFIL F., 2014. A new pest, *Duponchelia fovealis* Zeller, on strawberries in Turkey: damage, distribution and parasitoid. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, Adana, v. 2, p. 328-334, 2014.

ETHUR, L. Z.; COPATTI, A. S.; FIPKE, G. M.; CALVANO, C. C. A.; PAZINI, J. D. B.; 2014. Parasitic mycoflora of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from soils of the western frontier of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, Itaquí, v. 81, n. 1, p. 62-67, 2014.

FAN, Y.; FANG, W.; GUO, S.; PEI, X.; ZHANG, Y.; XIAO, Y.; LI, D.; LIN, K.; BIDOCHKA, M. J.; PEI, Y. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, Chongqing, v. 73, n. 1, p. 295-302, 2007.

FAQUAET, M. *Duponchelia fovealis*, een nieuwe soort voor de Belgische fauna (Lepidoptera: Pyralidae). **Phegea**, Wetteren, v. 28, n. 1, p. 13-14, 2000.

FUENTES, A.; ALMONACID, L.; OCAMPO, J. A.; ARRIAGADA, C. Synergistic interactions between a saprophytic fungal consortium and *Rhizophagus irregularis* alleviate oxidative stress in plants grown in heavy metal contaminated soil. **Plant Soil**, Temuco, v. 407, p. 355-366, 2016.

GUPTA, R.; SAXENA, R. K.; CHATURVEDI, P.; VIRDI, J. S. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. **Journal of Applied Bacteriology**, New Delhi, v. 76, p. 376-383, 1995.



HERRERA-ESTRELLA, A.; CHET, I. Chitinases in biological control. In: JOLLÉS, P.; MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin and Chitinases**. Irapuato: *EXS-BASEL*, 1999. pp. 171-184.

HU, J.; WEI, Z.; FRIMAN, V-P.; GU, S-H.; WANG, X-F.; EISENHAUER, N.; YANG, T-J.; MA, J.; SHEN, Q-R.; XU, Y-C.; JOUSSET, A. Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression. **MBio**, Nanjing, v. 7, n. 6, ID. e01790-16, 2016.

HUSSAIN, A. N.; ABBASI, S.; SHARIFI, R.; JAMALI, S. The effect of biocontrol agents consortia against *Rhizoctonia* root rot of common bean *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Crop Protection**, Kermanshah, v. 7, n. 1, p. 73-85, 2018.

KANG, B. R.; HAN, J. H.; KIM, J. J.; KIM, Y. C. Dual biocontrol potential of the entomopathogenic fungus, *Isaria javanica*, for both aphids and plant fungal pathogens. **Mycobiology**, Gwangju, v. 46, n. 4, p. 440-447, 2018.

KAVKOVÁ, M.; ČURN, V. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). **Mycopathologia**, České Budekovice, v. 159, p. 53–63, 2005.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; MOLLOY, M. P.; NEVALAINEN, H. K. M. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity in 2D gel. **Protein Expression Purification**, North Ryde, v. 32, p. 210-220, 2003.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, North Ryde, v. 31, p. 346-352, 2004.

KLEINER, A. A. P.; FERREIRA, A.; LIMA, A. O. S.; ANDREOTE, F. D.; PIMENTEL I. C.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; QUECINE, M. C.; MARTINS M. K.; LACAVA, P. T.; ROSSETO, P. B.; STUART, R. M.; ARAUJO, W. L. **Guia prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba: Calo, 2010.

KRAUSS, U.; BIDWELL, R.; INCE, J. Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of crown rot of banana. **Biological Control**, Santa Lucia, v. 13, n. 2, p.111-119, 1998.

KRAUSS, U.; HIDALGO, E.; ARROYO, C.; PIPER, S. R. Interaction between entomopathogenic *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the mycoparasites *Clonostachys* spp., *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. **Biocontrol Science and Technology**, Turrialba, v. 14, n. 4, p. 331-346, 2004.

LEOPOLD, J.; SAMSINÁKOVÁ, A. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Prague, v. 15, p. 34-42, 1970

NAVEEDA S. **Microbial consortium for the management of insect pest of bitter gourd (*Momordica charantia* L.)**. Tese (Doutorado em Agricultura) - Department of Agricultural Entomology College of Agriculture, Vellayani - Thiruvananthapuram. 2018.

PAES, J. P. P.; LIMA, V. L. S.; PRATISSOLI, D.; CARVALHO, J. R.; PIROVANI, V. D.; BUENO, R. C. O. F. Thermal requirements, development and number of generations of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Canoinhas, v. 90, n. 2, p. 2447-2457, 2018.

PELL, J. K.; HANNAM, J. J.; STEINKRAUS, J. J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, Hertfordshire, v. 55, p. 187–198, 2010.

PILARSKA, D. K.; SOLTER, L. F.; KERESSELIDZE, M.; LINDE, A.; HOCH, G. Microsporidian infections in *Lymantria dispar* larvae: Interactions and effects of multiple species infections on pathogen horizontal transmissions. **Journal of Invertebrate Pathology**, Sofia, v. 93, n. 2, p. 103-113, 2016.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R. M.; AZEVEDO, J. L. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environment conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 5, p. 705-711, 2006.

POITEVIN, G. C.; PORSANI, M. V.; POLTRONIERI, A. S.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, Curitiba, v. 53, n. 3, p. 323-331, 2018.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Journal of General Microbiology**, Denver, v. 134, p.169-176, 1988.

SAKAI, K.; YOKOTA, A.; KUROKAWA, H.; WAKAYAMA, M.; MORIGUCHI, M. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, Oita, v. 64, n. 9, p. 3397-3402, 1998.

SALEEM, A.-R.; IBRAHIM, R. A. Assessment of the virulence and proteolytic activity of three native entomopathogenic fungi against the larvae of *Oryctes Agamemnon* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, Almunawarah, v. 29, n. 1, p. 1-8, 2019.

SANTHANAM, R.; LUU, T. V.; WEINHOLD, A.; GOLDBERG, J.; OH, Y.; BALDWIN, I. T. Native root-associated bacteria rescue a plant from sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. **Proceedings of the National Academy of Science**, Jena, v. 112, n. 36, p. e5013-e5020, 2015.

SANTHANAM, R.; MENEZES, R. C.; GRABE, V.; LI, D.; BALDWIN, I. T.; GROTEN K. A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. **Molecular Ecology**, Jena, v. 28, n. 5, p. 1154-1169, 2019.

SARAVANAKUMAR, K.; YU, C.; DOU, K.; WANG, M.; LI, Y.; CHEN, J. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum. **Biological Control**, Shanghai, v. 94, p. 37-46, 2016

SHARMA, C. K.; VISHNOI, V. K.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mug bean. **Rhizosphere**, Haridwar, v. 5, p. 71-75, 2018.

SOLTER, L. F.; SIEGEL, J. P.; PILARSKA, D. K.; HIGGS, M. C. The impact of mixed infection of three species of microsporidia isolated from the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Urbana, v. 81, n. 2, p. 103-113, 2002.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Porto Alegre, v. 90, p. 135-143, 2004.

STOCKS, S. D.; HODGES A., 2012. **European pepper moth or Southern European marsh pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller)**. EDIS, v. 2012, n. 1, 2012. Disponível em: <<https://journals.flvc.org/edis/article/view/119490>>. Acesso em: 15 Jan. 2020

SZENTIVÁNYI, O.; VARGA, K.; WYAND, R.; SLATTER, H.; KISS, L. *Paecilomyces farinosus* destroys powdery mildew colonies in detached leaf cultures but not on whole plants. **European Journal of Plant Pathology**, Budapest, v. 115, p. 351–356, 2006.

TEATHER R.M., WOOD P.J., 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(4), 777-780, 1982.

VALADARES-INGLIS, M. C.; LOPES, R. B.; FARIA, M. R. Controle de atrópodes-praga com fungos entomopatogênicos. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020, p. 201-236.

VAN LENTEREN, J. C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, Wageningen, v. 57, p. 1-20, 2012.

WANG, D.; DENG, J.; PEI, Y.; LI, T.; JIN, Z.; LIANG, L.; WANG, W.; LI, L.; DONG, X. Identification and virulence characterization of entomopathogenic fungus *Lecanicillium attenuatum* against pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). **Applied Entomology and Zoology**, Hubei, v. 52, n. 3, p. 511-518, 2017.

YANG, W.; ZHENG, L.; LIU, H-X.; WANG, K-B.; YU, Y-Y.; LUO, Y-M.; GUO, J-H. Evaluation of the effectiveness of a consortium of three plant-growth promoting rhizobacteria for biocontrol of cotton Verticillium-wilt. **Biocontrol Science and Technology**, Huaian, v. 24, n. 5, p. 489-502, 2014.


ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; PIMENTEL, I. C.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A. S.; SOLIS, M. A. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, Curitiba, v. 34, n. 3, p. 91–95, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; POLTRONIERI, A. S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A. M.; BORBA, A. M.; PIMENTEL, I. C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, Curitiba, v. 114, p. 291-294, 2017.

## ANEXO 1 – PÁGINA DA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO II DESTA TESE.

Journal of Invertebrate Pathology 177 (2020) 107503

---




ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jip](http://www.elsevier.com/locate/jip)




---

### Increased mortality of the European pepper moth *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera:Crambidae) using entomopathogenic fungal consortia

Addressa Katiski da Costa Stuart<sup>\*</sup>, Jason Lee Furuie, Maria Aparecida Cassilha Zawadneak, Ida Chapaval Pimentel

*Department of Basic Pathology, Sector of Biological Sciences, Federal University of Paraná, PO Box 19031, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil*



---

**ARTICLE INFO**

---

**Keywords:**  
*Duponchelia fovealis*  
*Beauveria bassiana*  
 Biological control  
 Microbial consortium

**ABSTRACT**

---

The European pepper moth (*Duponchelia fovealis*) is an invasive pest affecting crops in many countries. The use of chemicals to control *D. fovealis* is not only ineffective but is hazardous to the environment. The most effective way to reduce this invasive species is biological control using entomopathogenic fungi. Furthermore, the use of combining entomopathogenic fungi is a novel and underexplored approach in the field of biocontrol research. The compatibility of different strains of *Beauveria bassiana*, *Purpureocillium lilacinum*, and *Isaria javanica* was evaluated by forming two-fungi consortia. The pathogenicity of these consortia against *D. fovealis*, as well as the related enzymatic activities, were investigated. Seven consortia increased *D. fovealis* mortality, showing synergistic activity. One consortium formed by two strains of *B. bassiana* produced highest control. Moreover, these consortia also demonstrated increased chitinase and lipase activities. Higher mortality of *D. fovealis* by these consortia was mainly associated with enzyme production. One consortium, also formed by two strains of *B. bassiana*, was unique in producing lower *D. fovealis* mortality than the two strains alone. The potential use of entomopathogenic fungal consortia is a promising alternative approach for biological control. Most of the consortia used in this study improved control of *D. fovealis*, showed synergistic activity and could be a suitable strategy to control this pest.

# 5 CAPÍTULO III

INTERAÇÃO METABÓLICA ENTRE LINHAGENS DE  
*Beauveria bassiana* NA FORMAÇÃO DE UM  
CONSÓRCIO, E SUA ATUAÇÃO CONTRA O SISTEMA  
IMUNE DE *Duponchelia fovealis*.

## 1 INTRODUÇÃO

Sistemas biológicos são de extrema complexidade e envolvem inúmeros fatores para desempenho de sua correta função e metabolismo. Por muito tempo, acreditou-se que apenas o estudo do DNA era suficiente para entender o funcionamento desses sistemas; entretanto, após muitos anos de estudo descobriu-se que, apenas as informações contidas no código genético não são suficientes para entender alguns eventos fenotípicos observados nos organismos vivos. Assim sendo, criou-se uma área conhecida como genômica funcional, onde técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas, de modo a entender melhor o funcionamento da célula, bem como cada etapa compreendida entre a informação genética e o fenótipo observado. A genômica funcional estuda, além do genoma, o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma, ou seja, o conjunto de RNAm transcritos, as proteínas e os metabólitos produzidos por um organismo, respectivamente (VILAS-BÔAS e GOMBERT, 2006 FRAGA-CORRAL et al., 2020).

A metabolômica é utilizada para avaliar o conjunto de metabólitos produzidos ou modificados por um organismo. Esses metabólitos participam de diversas reações químicas dentro da célula, e fazem parte de um complexo sistema regulatório que promove constantes modificações nessas moléculas, as quais podem estar direta ou indiretamente conectadas. Desta forma, diferente de outras técnicas da biologia molecular como a transcriptômica e a proteômica, a metabolômica representa informações integrativas da função celular, determinando a função gênica em resposta a alterações genéticas e ambientais (VILAS-BÔAS e GOMBERT, 2006 FRAGA-CORRAL et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Por esta e outras razões, é uma excelente alternativa para avaliar o impacto de diferentes variáveis, causados aos organismos.

Essa técnica pode ser aplicada aos mais diversos organismos para análises fenotípicas, morfológicas e tem sido amplamente utilizada em diagnósticos clínicos, na descoberta de novas drogas, bem como em estudos de biologia, onde o objetivo pode ser a separação de indivíduos genotípicamente distintos ou a avaliação da resposta metabólica de um organismo sob uma situação de estresse (REGIANI et al., 2013). Em especial na agricultura, a metabolômica pode ser utilizada para entender a fisiologia e bioquímica de diferentes plantas, avaliar a segurança alimentar e impactos ambientais, bem como avaliar a segurança de organismos geneticamente modificados

(OGMs) para consumo humano. Além disso, a metabolômica pode ser de extrema importância no entendimento da relação planta-patógeno, estudando microrganismos patogênicos, insetos praga, inimigos naturais e eventos como o controle biológico (DIXON et al., 2006). Portanto o emprego de diferentes técnicas para avaliação do metaboloma faz-se muito importante e até necessário para um melhor entendimento dos processos biológicos a serem estudados.

A metabolômica não direcionada (MND), analisa todas as possíveis moléculas de um determinado sistema biológico, baseada em separações cromatográficas como cromatografia líquida (LC) ou cromatografia gasosa (GC) acopladas a espectrômetros de massas (MS), proporcionando alta sensibilidade e especificidade molecular. Entretanto, não existe apenas uma técnica que forneça um espectro completo do metaboloma de uma amostra, desta forma o emprego de diferentes técnicas de separação (como LC e GC) juntamente com o MS tem sido utilizadas para obtenção de uma cobertura metabólica mais ampla (NAZ et al., 2014).

A separação cromatográfica ocorre por polaridade através da utilização de uma fase estacionária (coluna cromatográfica) e uma fase móvel (líquida no LC e gasosa no GC) que irá carrear as moléculas até o detector. A LC é utilizada principalmente para análise de moléculas não voláteis, como álcoois, fenóis e terpenos, que possuem alta massa molecular e que são muito polares. A GC analisa moléculas de baixa massa molecular e que sejam termicamente estáveis, como açúcares, ácidos orgânicos e ésteres, podendo ser submetidas à altas temperaturas e ser vaporizadas sem sofrer decomposição (REGIANI et al., 2013). GC e LC são então técnicas complementares, que fornecem uma leitura abrangente dos metabólitos constantes em determinada amostra e que podem trazer uma importante caracterização dos efeitos causados por diferentes estímulos. Desta forma, após observar, no capítulo anterior, um aumento na mortalidade de lagartas de *D. fovealis* inoculadas com um consórcio fúngico, no presente capítulo buscamos avaliar, através de GC-MS e LC-MS/MS, os metabólitos envolvidos na formação de um consórcio fúngico, bem como os metabólitos envolvidos no processo de controle e sobrevivência do inseto em questão.



## REFERÊNCIAS

- DIXON, R. A.; GANG, D. R.; CHARLTON, A. J.; FIEHN, O.; KUIPER H. A.; REYNOLDS, T. L.; TJEERDEMA, R. S.; JEFFERY, E. H.; GERMAN, B.; RIDLEY, W. P.; SEIBER, J. N. Applications of metabolomics in agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oklahoma, v. 54, p. 8984-8994, 2006.
- FRAGA-CORRAL, M.; CARPENA, M.; GARCIA-OLIVEIRA, P.; PEREIRA, A. G.; PRIETO, M. A.; SIMAL-GANDARA, J. Analytical metabolomics and application in health, environmental and food science. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Bragança, p. 1-23, 2020.
- NAZ, S.; SANTOS, D. C. M.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Analytical protocols based on LC-MS, GC\_MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. **Bioanalysis**, Madrid, v. 6, n. 12, p. 1657-1677, 2014.
- REGIANI, T.; BUDZINSKI, I.; GONZALES, S. G.; LABATE, M. T. V.; CONTINGUIBA, F.; MARQUES, F. G.; MORAES, F. E.; LABATE, C. A. Eletroforese, Cromatografia e espectrometria de massas. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Ed). **Ômica 360°**. Viçosa: Suprema, 2013, p. 124-152.
- VILAS-BÔAS, S. G.; BOMBERT, A. K. Análise de metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 9, n. 36, p. 58-69, 2006.
- ZHANG, X.-U.; LI, Q.-H.; XU, Z.-D.; DOU, J.-J. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medicine science: a systematic review. **RSC Advances**, v. 10, p. 3092-3104, 2020.

## 5.1 ARTIGO III - CONSÓRCIO DE DUAS LINHAGENS DE *Beauveria bassiana* AUMENTA SUA VIRULÊNCIA, CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA AO ESTRESSE: UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA.

### RESUMO

A utilização de dois ou mais microrganismos em consórcios microbianos vêm sendo amplamente investigada para o controle biológico de doenças e pragas. *Beauveria bassiana* é uma das espécies de fungos mais estudadas no controle biológico, ainda assim, pouco se sabe sobre sua atuação e interação na formação de consórcios fúngicos. Em trabalhos prévios, nosso grupo constatou que um consórcio formado por duas linhagens de *B. bassiana*, tem seu potencial de biocontrole significativamente aumentado contra lagartas polífagas da espécie *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). No presente trabalho avaliamos através de GC-MS e LC-MS/MS, os metabólitos produzidos nessa interação. Foram detectadas, por LC-MS/MS, 138 moléculas no modo negativo e 127 no modo positivo, e 132 moléculas por GC-MS. Das moléculas detectadas 21 são biomarcadores do consórcio, 14 identificadas por LC-MS/MS e sete por GC-MS. Dentre os metabólitos identificados estão o ácido etanimídico, [10]-Dehidroshogaol, L-homocisteína, xantina, D-manose, ácido 1,4-Di-O-cafeoilquínico, N-araquidonoil tirosina, prostaglandina J2, adenosina-5'-monofosfato e uridina-3-fosfato, glicerofosfolipídios e oxilipinas. As ações antioxidante e anti-inflamatória são o seu principal mecanismo de atuação. Esses metabólitos são capazes de suprimir o sistema imune do inseto, deixando-o mais vulnerável e, conseqüentemente, aumentar a virulência fúngica. No presente artigo, propomos um modelo de atuação dos metabólitos secretados pelo consórcio, na mortalidade do inseto, através de mecanismos de inibição da secreção de interleucinas pró-inflamatórias, migração e agregação celular, inibição da transcrição de genes e vias pró-inflamatórias como Dif, Dorsal e Relish, JAK/STAT e JNK, bem como de limpeza de moléculas oxidativas como ROS, NOS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e indução de fatores de virulência.

**Palavras-chave:** Metabolômica. GC-MS. LC-MS/MS. *Beauveria bassiana*. Controle biológico.

FUNGAL CONSORTIUM OF TWO *Beauveria bassiana* STRAINS INCREASES THEIR VIRULENCE, GROWTH, AND RESISTANCE TO STRESS: A METABOLOMIC APPROACH.

**ABSTRACT**

The use of two or more microorganisms in a microbial consortium is an expanding field for the biological control of diseases and pests. *Beauveria bassiana* is one of the most widely studied fungal species in biological control, yet little is known about its role in fungal consortiums. In a previous study, our group found that a consortium formed by two strains of *B. bassiana* had significantly greater biocontrol potential against the polyphagous caterpillars *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) than either strain on its own. In this study, we use GC-MS and LC-MS/MS to evaluate and discuss the metabolites of the consortium. A total of 21 consortium biomarkers were identified, corresponding to 14 of the 138 molecules of negative mode and 127 of positive mode, detected by LC-MS/MS and seven of the 132 detected using GC-MS. Among the identified metabolites are the ethanimidic acid, [10]-Dehydroshogaol, L-homocystine, xanthin, D-mannose, 1,4-Di-O-caffeoylquinic acid, N-arachdonoyl tyrosine, prostaglandin J<sub>2</sub>, adenosine-5'-monophosphate and uridine-3-phosphate, glycerophospholipids and oxylipins. Antioxidant and anti-inflammatory are the main properties of the metabolites produced by the consortium. These metabolites can depress the insect's immune system, increasing its vulnerability and, hence, the fungal virulence of the consortium. In light of the metabolites secreted by the consortium, we propose an action model of insect mortality. The model includes the inhibition of defense mechanisms such as pro-inflammatory interleukin secretion, cell migration, cell aggregation, Dif, Dorsal, and Relish gene transcription, JAK/STAT and JNK signaling pathways, as well as promoting the cleaning of oxidative molecules like ROS, NOS, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the induction of virulence factors.

Keywords: Metabolomics. GC/MS. LC-MS/MS. *Beauveria bassiana*. Biological control.

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos têm sido utilizados com sucesso no controle de pragas agrícolas. Estes fungos infectam insetos praga ao entrar em contato direto com sua cutícula ou quando estes se alimentam de folhas ou frutos contaminados pelos fungos. Após o contato com o inseto, o fungo entomopatogênico penetra em sua cavidade corporal, desenvolvendo-se e colonizando-o internamente, ocasionando sua morte (PELL, HANNAM E STEINKRAUSS, 2010). Os mecanismos biológicos envolvidos na virulência dos fungos entomopatogênicos abrangem diversas e complexas etapas que vão desde o reconhecimento e adesão a cutícula do inseto, à produção de diversas moléculas, incluindo enzimas hidrolíticas como lipases, celulasas, proteases e quitinases; metabólitos primários e secundários que irão facilitar a infecção, como toxinas, pigmentos e supressores imunológicos; além do aumento na taxa de germinação e formação de estruturas especializadas de infecção, como o apressório e os blastósporos (KHACHATOURIANS e QAZI, 2006; ORTIZ-URQUIZA e KEYHANI, 2013; QU e WANG, 2018). Um dos principais gêneros de fungos que compõem este grupo é o *Beauveria*. Espécies deste gênero produzem diversos metabólitos tóxicos, como a beauvericina e bassianolida, que auxiliam na atividade inseticida dos fungos e são os mais amplamente estudados. Dentro do gênero, destaca-se a espécie *Beauveria bassiana*, que além de beauvericina e bassianolida, são responsáveis pela produção de outras moléculas inseticidas como a tenellina, bassianina, beauverolidas, bassiatina e oosporeina (GIBSON et al., 2014). Estes e outros metabólitos são muito importantes no controle biológico promovido por *B. bassiana* (QUESADA-MORAGA, CARRASCO-DÍAZ e SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006).

Apesar da recente evolução e dos crescentes recursos e esforços para entender melhor o metabolismo fúngico e seus produtos, os metabólitos, muito ainda há para ser descoberto (KELLER, 2019). Dentro deste contexto, a metabolômica, representa um modelo de estudo necessário para avaliar o conjunto de metabólitos produzidos ou modificados por um organismo e sua relação com o ambiente. Estes metabólitos participam de diversas reações químicas dentro da célula, e fazem parte de um complexo sistema regulatório que promove constantes modificações nestas moléculas, as quais podem estar direta ou indiretamente conectadas. Desta forma, a metabolômica representa informações integrativas da função celular, determinando

os metabólitos produzidos em resposta a alterações genéticas e ambientais (DIXON et al., 2006; VILAS-BÔAS e GOMBERT, 2006 FRAGA-CORRAL et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Por esta e outras razões, é uma excelente alternativa para avaliar o impacto de diferentes variáveis causado à determinados organismos. Na agricultura, esta técnica pode ser de extrema importância no entendimento da relação entre microrganismos patogênicos e insetos praga. Técnicas de genômica e transcriptômica têm sido amplamente utilizadas para elucidar essa interação (XIAO et al., 2012; ORTIZ-URQUIZA e KEYHANI, 2016; HE et al., 2018; DING et al., 2020), entretanto, devido às muitas modificações sofridas à nível molecular, a metabolômica faz-se essencial para uma observação do real panorama metabólico, uma vez que este é o nível mais próximo do que se observa fenotípicamente.

Estudos recentes têm demonstrado importante avanço no controle biológico de pragas, apresentando aumento no potencial patogênico quando da associação de diferentes microrganismos, atuando como consórcio microbiano (SANTHANAM et al., 2015; CANFORA et al., 2017; SHARMA et al., 2018; SANTHANAM et al., 2019, STUART et al., 2020). Além disso, diversos outros benefícios têm sido relatados tanto para as plantas, quanto para o solo e outros biomas (REDDY e SARAVANAN, 2013; MISHRA e MALIK, 2014; MURPHY, DOOHAN e HODKINSON, 2018). Apesar da enorme importância da atuação de consórcios microbianos no biocontrole, pouco se sabe sobre a interação destes microrganismos e sobre os metabólitos envolvidos em tal processo. Em 2017, Canfora et al. avaliaram o comportamento de crescimento e resposta metabólica (respiração) de duas espécies do gênero *Beauveria* em co-cultivo em diferentes fontes de carbono. Eles constataram, através da técnica *Phenotype MicroArray*®, que fontes como L-Asparagina, Ácido L-Aspártico, Ácido L-Glutâmico, m-Eritritol, D-Melezitose e D-sorbitol, provocam importantes alterações no comportamento metabólico dos fungos quando cultivados em conjunto, tendo observado uma taxa metabólica maior do que nos fungos cultivados em separado. Além disso, as análises de *SSR markers* e qPCR mostraram que diferentes substratos podem promover o crescimento de uma espécie sobre a outra, a depender de seu nicho ecológico, e que isso pode ser essencial para a co-existência das diferentes espécies, bem como estar relacionadas à sua virulência.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que, o uso de duas linhagens de *Beauveria bassiana* (Bov 3 e Bov 2) em conjunto, como consórcio fúngico, foi capaz de aumentar a mortalidade do inseto praga *Duponchelia fovealis*

(Lepidoptera: Crambidae) (STUART et al., 2020). Desta forma, neste trabalho, buscamos avaliar por metabolômica não direcionada, através das cromatografias gasosa e líquida acopladas à espectrômetros de massas (GC-MS e LC-MS/MS), as alterações metabólicas causadas pelo co-cultivo dessas linhagens e correlacionar os metabólitos produzidos por esse consórcio com a maior mortalidade de *D. fovealis* observada por Stuart e colaboradores (2020).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico foi composto por duas linhagens (Bov 3 e Bov 2) geneticamente distintas de *B. bassiana* cultivadas separadamente e em co-cultivo (consórcio) de acordo com Stuart et al. (2020). Culturas monospóricas das linhagens fúngicas foram cultivadas separadamente em placa de Petri contendo meio de cultura Ágar Sabouraud (SBR), em incubadora BOD por 14 dias a 28 °C no escuro. Passado esse período foram preparadas soluções de conídios de cada linhagem conforme segue: o micélio e os conídios foram raspados do meio de cultura com auxílio de uma espátula de metal estéril e transferidos para um tubo contendo solução salina a 0,85% (NaCl contendo 0.01% de Tween 80®). Esta suspensão foi homogeneizada e filtrada em gaze estéril, os conídios foram contados em câmara de Neubauer e então diluídos para a concentração de uso ( $1 \times 10^8$  conídios. mL<sup>-1</sup>). Em seguida, 30 µL da suspensão de conídios de cada linhagem foram inoculados em uma nova placa de Petri contendo ágar SBR e incubados nas mesmas condições anteriormente descritas.

### 2.2 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS

A extração de metabólitos fúngicos foi realizada de acordo com Hoffman et al., (2010), com pequenas modificações. Após o crescimento das colônias, o micélio de cada condição a ser estudada (Bov 2; Bov 3 e Consórcio) foi separadamente raspado do meio de cultura com auxílio de uma espátula e triturado com nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>). A extração foi realizada a partir de 200 mg do triturado fúngico, ao qual foi adicionado 1 mL da solução extratora gelada, composta por metanol:clorofórmio:água (6:2:2). Os microtubos foram vigorosamente agitados em vórtex e levados ao banho ultrassônico a 20 Hz.s<sup>-1</sup> por 15 minutos, mantido a baixa temperatura. Em seguida as amostras foram centrifugadas (Eppendorf, Germany) por 10 minutos a 14000 rpm e 4 °C, o sobrenadante foi filtrado em filtro Whatman® 0,22 µm (Merck, Germany) e transferido para um *vial* cromatográfico onde a solução foi liofilizada (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) até total secagem dos extratos. Por fim, as amostras liofilizadas foram ressuspensas em 200 µL de solução extratora e aliqüotadas para utilização no GC-MS e no LC-MS/MS.

## 2.3 ANÁLISE DE METABOLÔMICA NÃO DIRECIONADA

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética de Plantas Max Feffer da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Foram analisadas três réplicas técnicas de cada uma das cinco réplicas biológicas, totalizando 15 conjuntos de dados para cada tratamento (Bov 3, Bov 2 e consórcio), além disso, como controle de qualidade (CQ), foram criados *pools* de metabólitos para cada grupo, os quais foram injetados previamente às amostras do grupo, visando condicionar e equilibrar o sistema.

### 2.3.1 Identificação de metabólitos por GC-MS

Após a extração de metabólitos os extratos foram alíquotados para a realização das análises de GC-MS e LC-MS/MS. À alíquota do extrato destinada ao GC-MS, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  dos compostos isotopicamente marcados: ácido succínico (D4, 98% - DLM 584-5), ácido mirístico (1, 2, 3 – 13C3, 99% - CLM 3665-0.5) e ácido palmítico (1, 2, 3, 4 – 13C4), preparados na concentração de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  que foram utilizados como padrões externos. Em seguida a amostra foi novamente liofilizada para a conseguinte realização da derivatização, utilizando-se 30  $\mu\text{L}$  de metoxiamina (15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em piridina, por 16 h em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a siliilação, adicionando às amostras 30  $\mu\text{L}$  de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) e mantendo em temperatura ambiente por 1 h. Por fim, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de heptano contendo 15  $\text{ng/g}$  de metil esterase. Posteriormente, as amostras foram analisadas de acordo com Budzinski et al., (2016b), com pequenas modificações, através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Nessa etapa, foram utilizados uma série de n-alcanos ( $\text{C}_{12}$  –  $\text{C}_{40}$ ), o que permite calcular o índice de retenção das amostras (JONSSON et al., 2005). Um microlitro de cada uma das amostras derivatizadas foi injetado automaticamente em modo *splitless* pelo amostrador automático CTC Combi Pal Xt Duo (CTC Analytics AG, Suíça) no cromatógrafo gasoso Agilent 7890A equipado com duas colunas capilares de sílica fundida, uma com 20 m x 0.18 mm x 0.18  $\mu\text{m}$  do filme DB-5 (Agilent) como fase estacionária e a segunda com 0.9 m x 0.10 mm x 0.10  $\mu\text{m}$  do filme RX-T 17 (Restek) como fase estacionária. A temperatura de injeção foi de 280  $^{\circ}\text{C}$ , com fluxo de purga de 20  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O fluxo de



gás através da coluna foi de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , a temperatura da coluna foi mantida a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 min e em seguida aumentando em  $15 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  até atingir  $320 \text{ }^\circ\text{C}$ , onde foi mantida por 4 min. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons do GC x GC/TOF-MS Pegasus 4D (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA), sob temperatura de  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ . O feixe de elétrons foi gerado a 70 eV com uma corrente de ionização de 20 mA e 20 espectros  $\cdot \text{s}^{-1}$ , registrados na faixa de 45-800  $m/z$ . A voltagem do detector foi de 1500 V.

O processamento dos dados de GC-MS foi no programa ChromaTOF, versão 4.32, no qual foi realizado correção da linha de base, deconvolução, obtenção do índice de retenção (RI), correção do tempo de retenção (RT), identificação e alinhamento de picos e identificação dos metabólitos com o auxílio da biblioteca da NIST, versão 11. Foram considerados metabólitos válidos apenas aqueles com score igual ou maior a 700. A intensidade de cada metabólito foi normalizada pela contagem iônica total (TIC) de cada amostra.

As análises estatísticas foram realizadas no *software online MetaboAnalyst* 4.0 (CHONG, WISHART e XIA, 2019, disponível em <http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>). Os dados foram transformados por  $\log^2$  e escalonados por Pareto, que utiliza a raiz quadrada do desvio padrão para escalonar cada variável encontrada (VAN DEN BERG et al., 2006). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) com  $p \leq 0.05$  ajustado por *False Discovery Rate* (FDR); análise de correlação, usada para visualizar a correlação entre as diferentes amostras, análise de componente principal (PCA), análise multivariada e não supervisionada que avalia a inter-relação entre um conjunto de dados e explica essas variáveis em seus componentes, e análise de enriquecimento *Metabolite Set Enrichment Analysis* (MSEA), a qual investiga e atribui padrões de significado biológico à determinado grupo de metabólitos que estão significativamente enriquecidos.

### 2.3.2 Identificação de metabólitos por LC-MS/MS

Imediatamente antes da corrida de LC-MS, as amostras foram eluídas em 200  $\mu\text{L}$  da solução extratora e vigorosamente agitadas até total dissolução dos metabólitos. A quercetina ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ ) foi usada como padrão externo. Os perfis metabólicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (UPLC-MS). As amostras foram inicialmente injetadas

em um cromatógrafo Acquity com uma coluna de fase reversa (Acquity UPCL HSS 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 100 mm—Waters Corporation, MA, USA) condicionada a 35 °C. Os solventes de eluição foram: A) H<sub>2</sub>O com Ácido fórmico 0.1% e B) Acetonitrila (ACN) com ácido fórmico 0.1%. A proporção de solventes foi mudando ao longo da corrida cromatográfica, iniciando em 95% de solvente A e 5% de B. O gradiente aumentou de forma linear para 75% A e 25% B nos próximos 6 minutos. Inverteu-se a polaridade para 25% A e 75% B por 6 minutos e, por fim 5% A e 95% B por um minuto. A corrida teve duração total de 14 minutos. Após a separação no cromatógrafo líquido, as amostras foram automaticamente injetadas e analisadas em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo - *time off light* (Q-TOF) Ultima API (Waters Corporation, MA, USA) de alta resolução, com ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo e negativo, nas seguintes condições: temperatura da fonte 150 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, voltagem de capilar de 3 kV e a voltagem do cone 35 V. O fluxo de nitrogênio no cone foi de 50 L/hr e de dessolvatação foi de 550 L/hr. Os espectros foram adquiridos na faixa de *m/z* 100-1200. O equipamento foi previamente calibrado com uma solução padrão de 0,05 mM de formiato de sódio em solução de ACN:H<sub>2</sub>O (90:10), que também foi usada como *lock-mass*, corrigindo os valores de *m/z* durante a corrida. O fluxo dos solventes foi de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>.

Os dados gerados foram pré-processados no *software* MassLynx 4.1 (Waters Corporation, MA, USA). Neste programa é feita a remoção de ruídos, alinhamento de picos, deconvolução, normalização pela contagem total de íons (TIC) e detecção de picos. Após esta etapa os dados da área de pico foram exportados para um arquivo Excel (Microsoft). Os íons que apresentaram valor igual a zero em 50% ou mais amostras dentro de cada grupo, tiveram todos os valores zerados, visando a eliminação de falsos-positivos. Os dados foram então analisados no *software* online Metaboanalyst 4.0 (CHONG, WISHART e XIA, 2019), transformados em log e escalonados por Pareto. Foram então realizadas análises de ANOVA e PCA. Os metabólitos que mais contribuíram para a separação dos grupos comparados foram direcionados para a fragmentação (MS/MS) e identificação.

A fragmentação foi realizada nas mesmas condições da fonte de ionização descritas anteriormente, utilizando energias de colisão entre 15 eV – 50 eV. Após fragmentados a procura pelos metabólitos foi realizada no banco de dados *Human Metabolome Database* (HMDB) utilizando-se um erro de massa de até 0.1 Da e considerando o aduto de [M-H]<sup>-</sup> para o modo negativo e [M+H]<sup>+</sup> para o modo positivo.

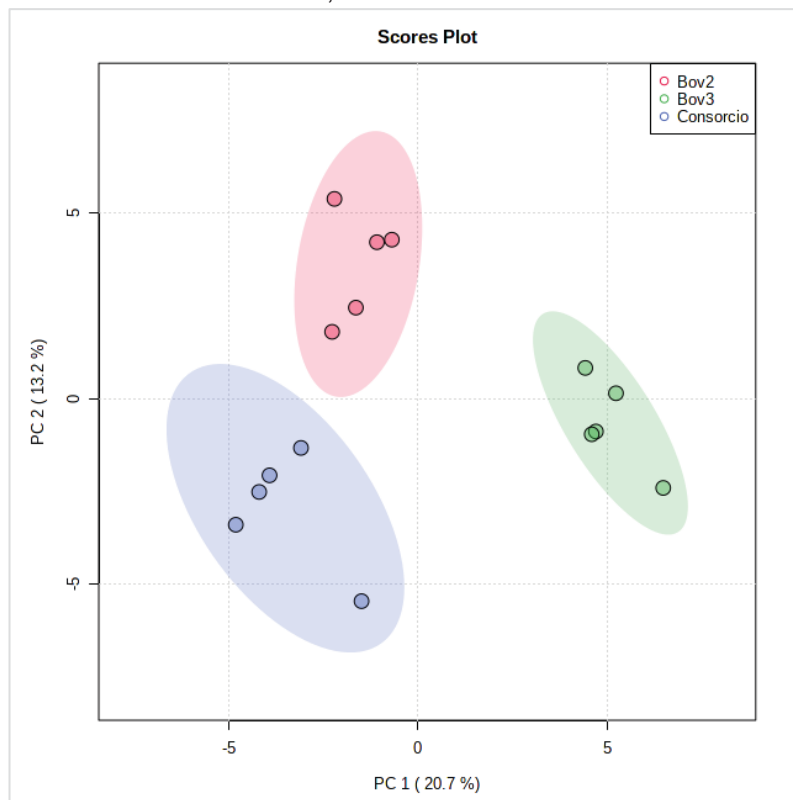
As estruturas das moléculas foram importadas e passaram por uma fragmentação *in silico* no programa *ACD/MS Structure ID suite* (ACD/labs, Toronto, Canadá) e o perfil de fragmentação de cada molécula, proposto pelo programa, foi comparado aos fragmentos gerados pelo MS/MS e a identificação dos metabólitos foi aceita ou refutada de acordo com a similaridade. Moléculas que apresentaram similaridade superior a 90% foram consideradas identificadas e moléculas com similaridade inferior a isso foram consideradas por sua classe.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR GC-MS

Através da análise de GC-MS foi possível identificar 132 moléculas (APÊNDICE 1). Pela análise de PCA observamos a formação de três *clusters* bem definidos, com a soma dos componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2) de 33.9 % (FIGURA 1), demonstrando uma tendência de separação dos grupos sem a presença de outliers.

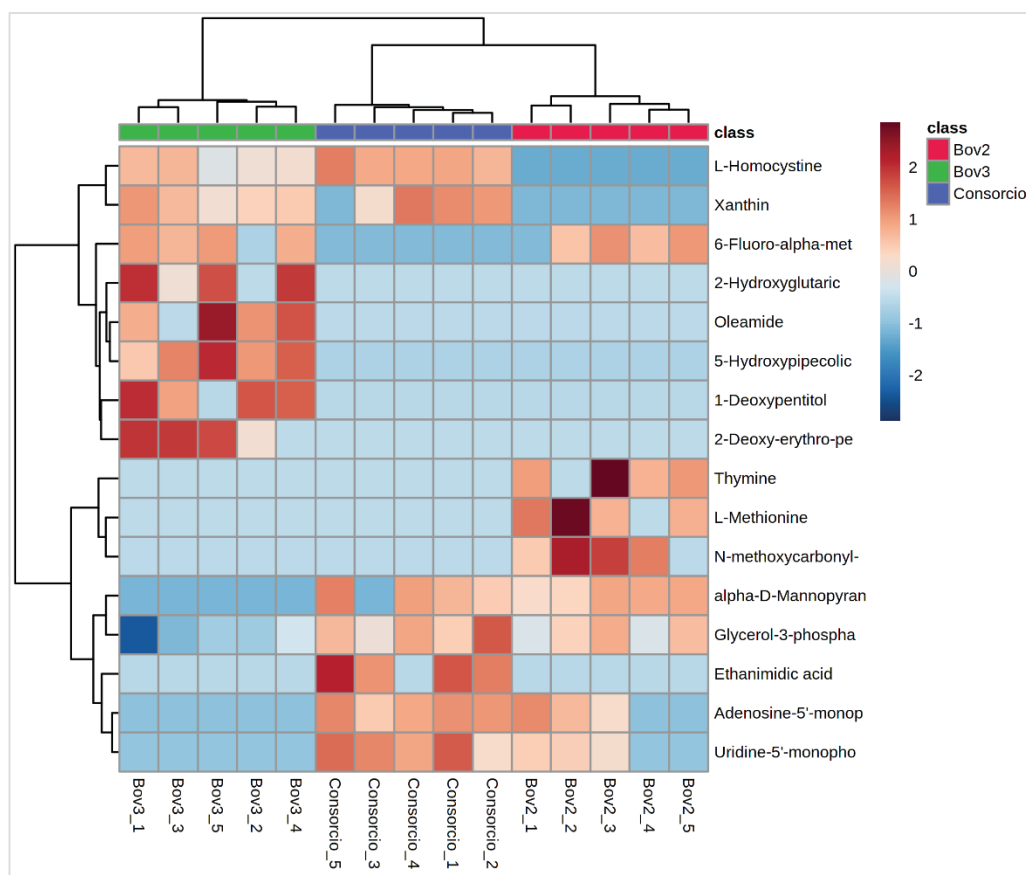
FIGURA 1 - 2-D SCORE PLOT DA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS EM BOV 2, BOV 3 E NO CONSÓRCIO POR GC-MS.



FONTE: A autora (2021)

A ANOVA apontou 16 biomarcadores nos três grupos analisados os quais foram submetidos a análise de correlação e estão representados pelo *heatmap* (FIGURA 2), dos quais seis apresentaram diferença estatística ( $p \leq 0.05$ ) por sua maior abundância no consórcio e um é único deste grupo (TABELA 1).

FIGURA 2 – HEATMAP DOS 16 BIOMARCADORES IDENTIFICADOS NOS TRÊS GRUPOS AVALIADOS.



FONTE: A autora (2021)

TABELA 1. BIOMARCADORES QUE APRESENTARAM MAIOR ABUNDÂNCIA NO CONSÓRCIO FRENTE AOS DEMAIS GRUPOS.

Metabólito	Valor-f	Valor-p	$-\log_{10}(p)$	FDR	Grupo mais abundante
alfa-D-Manopiranose (D-manose)	14.655	6.01E-04	3.2213	0.02	Consórcio
Adenosina-5'-monofosfato	13.5	8.49E-04	3.0713	0.02	Consórcio
L-Homocisteína	100.64	3.17E-08	7.4987	0.00	Consórcio
Uridina-5'-monofosfato	18.679	2.07E-04	3.6851	0.01	Consórcio
Xantina	11.903	0.001417	2.8486	0.02	Consórcio
Glicerol-3-fosfato	11.741	0.0014965	2.8249	0.02	Consórcio
Ácido etanimídico	-	-	-	-	Único Consórcio

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: Valor-f: razão entre variâncias; Valor-p.: probabilidade de significância;  $-\log_{10}(p)$ : Valor-p transformado por  $-\log_{10}$ ; FDR: *False Discovery Rate*.

A correlação destes 16 biomarcadores, demonstrada pelo *heatmap*, aponta um perfil metabólico mais próximo entre o consórcio e Bov 2 crescido isoladamente. Apesar disso, os perfis metabólicos de Bov 2 e do consórcio são significativamente diferentes, formando grupos distintos nas análises de PCA.

Os metabólitos com maior abundância no consórcio são compostos orgânicos classificados de diferentes formas. A Adenosina-5'-monofosfato e a Uridina-5'-monofosfato, são classificadas como monofosfatos de ribonucleotídeos púricos e pirimídicos, respectivamente. A D-mannose é uma hexose, a L-Homocisteína é classificada como um L-alfa-aminoácido e a Xantina pertence a classe das xantinas. O Glicerol-3'-fosfato é classificado como um glicerofosfato (TABELA 2). Não foi encontrada classificação para o ácido etanimídico nas bases de dados consultadas (HMDB e PubChem)

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR GC-MS NO CONSÓRCIO.

Metabólito	Classificação	Descrição
Adenosina-5'-monofosfato	Monofosfato de Ribonucleotídeos Púricos	A adenosina 5'-monofosfato é uma purina que tem a adenina como nucleobase. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como Monofosfato de Ribonucleotídeos Púricos. Estes são nucleotídeos consistindo de uma purina ligada a uma ribose e um grupo monofosfato.
Uridina-5'-monofosfato	Monofosfato de Ribonucleotídeos Pirimídicos	A Uridina-5'-monofosfato é uma pirimidina que tem a uracila como nucleobase. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como Monofosfato de ribonucleotídeos Pirimídicos. Estes são ribonucleotídeos que consistem de uma pirimidina ligada a uma ribose e um grupo monofosfato.
D-mannose	Hexose	Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como hexoses. Esses são monossacarídeos nos quais o açúcar contém seis carbonos.
L-Homocisteína	L-alfa-aminoácidos	Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como L-alfa-aminoácidos. Nestes alfa aminoácidos o carbono alfa está na configuração L.
Xantina	Xantinas	Base púrica intermediária da degradação de a Adenosina monofosfato em ácido úrico, sendo formado pela oxidação da hipoxantina. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como xantinas. Estes são derivados de purina com um grupo cetona ligada aos carbonos dois e seis.
Glicerol-3-fosfato	Glicerofosfatos	Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como glicerofosfatos. Os glicerofosfatos são compostos que contêm um glicerol ligado a um grupo fosfato.
Ácido etanimídico	-	-

FONTE: A autora (2021)

A *Metabolite Set Enrichment Analysis* (MSEA) identificou um padrão de enriquecimento de quatro importantes vias no consórcio, são elas: Biossíntese de Fosfolipídios ( $p \leq 0.002$ ), Metabolismo de Purinas ( $p \leq 0.004$ ), Metabolismo de Pirimidinas ( $p \leq 0.02$ ) e Metabolismo da Cisteína ( $p \leq 0.07$ ) (TABELA 3). A taxa de enriquecimento pode ser visualizada na FIGURA 3.

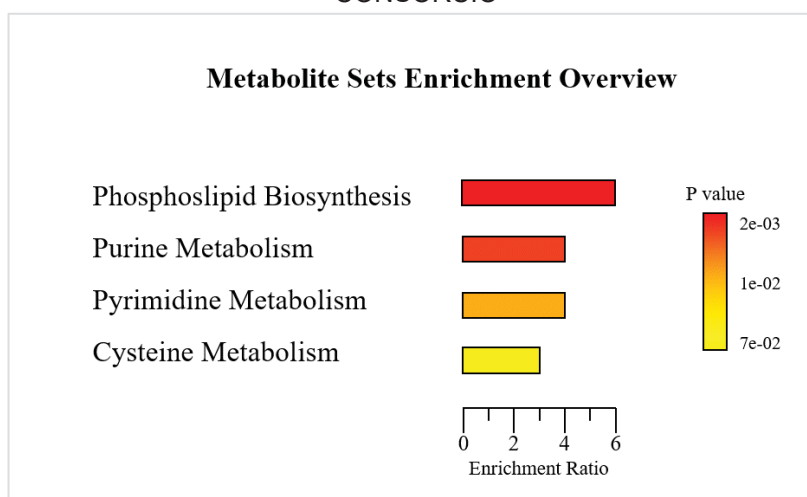
TABELA 3. VIAS METABÓLICAS ENRIQUECIDAS NO CONSÓRCIO PELA *METABOLITE SET ENRICHMENT ANALYSIS* (MSEA).

Via metabólica	Hits	Molécula	Valor-p	Holm-p	FDR
Biossíntese de Fosfolipídios	1	Glicerol-3-fosfato	2.73E-03	2.18E-02	2.88E-03
Metabolismo de Purinas	2	Adenosina-5'-monofosfato Xantina	4.31E-03	1.25E-01	7.79E-02
Metabolismo de Pirimidinas	1	Uridina-5'-monofosfato	1.69E-02	4.74E-01	7.79E-02
Metabolismo da Cisteína	1	L-Homocisteína	7.79E-02	1.00E+00	7.79E-02

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: Hits: Número de moléculas identificadas neste trabalho que estão presentes na via; Valor-p.: probabilidade de significância; Holm-p: Valor-p transformado pelo método de Holm; FDR: *False Discovery Rate*.

FIGURA 3 – TAXA DE ENRIQUECIMENTO DAS VIAS METABÓLICAS ENRIQUECIDAS NO CONSÓRCIO



FONTE: A autora (2021)

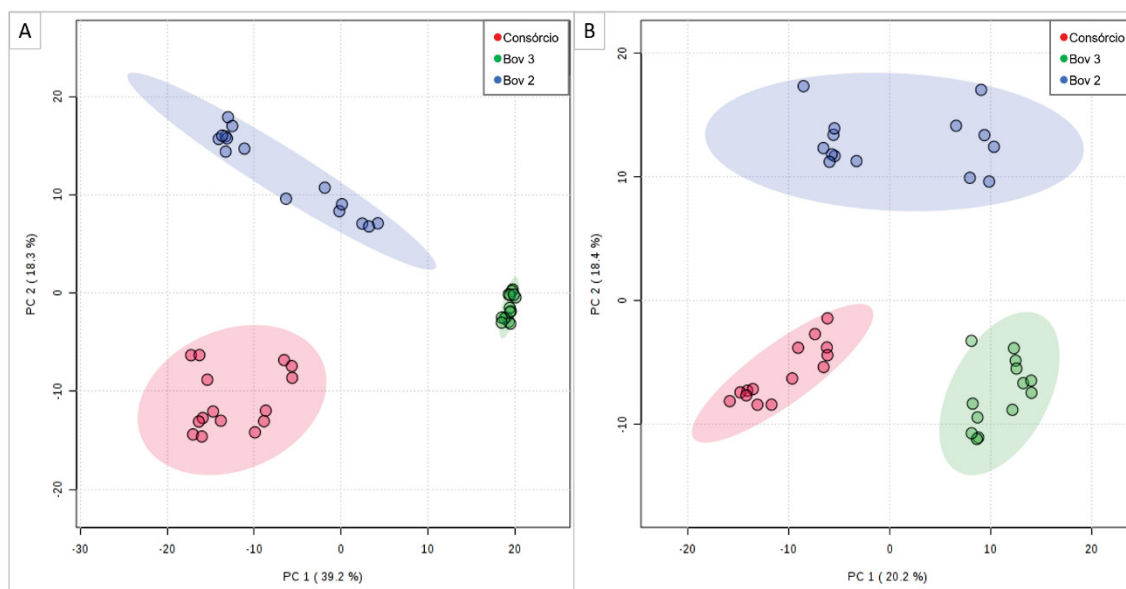
LEGENDA: *P-value* (Valor-p): probabilidade de significância.

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR LC-MS/MS

Foram obtidas 138 moléculas no modo negativo e 127 no modo positivo. Após a análise de PCA pudemos observar uma tendência separação entre os grupos analisados (Bov 2, Bov 3 e Consórcio), cada um formando seu próprio *cluster* sem a

presença de outliers. PC1 somado com PC2 foi de 57.5 % para o modo negativo e 38.6 % para o modo positivo (FIGURA 4).

FIGURA 4 – 2-D SCORE PLOT DA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS EM BOV 2, BOV 3 E NO CONSÓRCIO POR LC-MS.



FONTE: A autora (2021)  
 LEGENDA: A) modo negativo;  
 B) modo positivo.

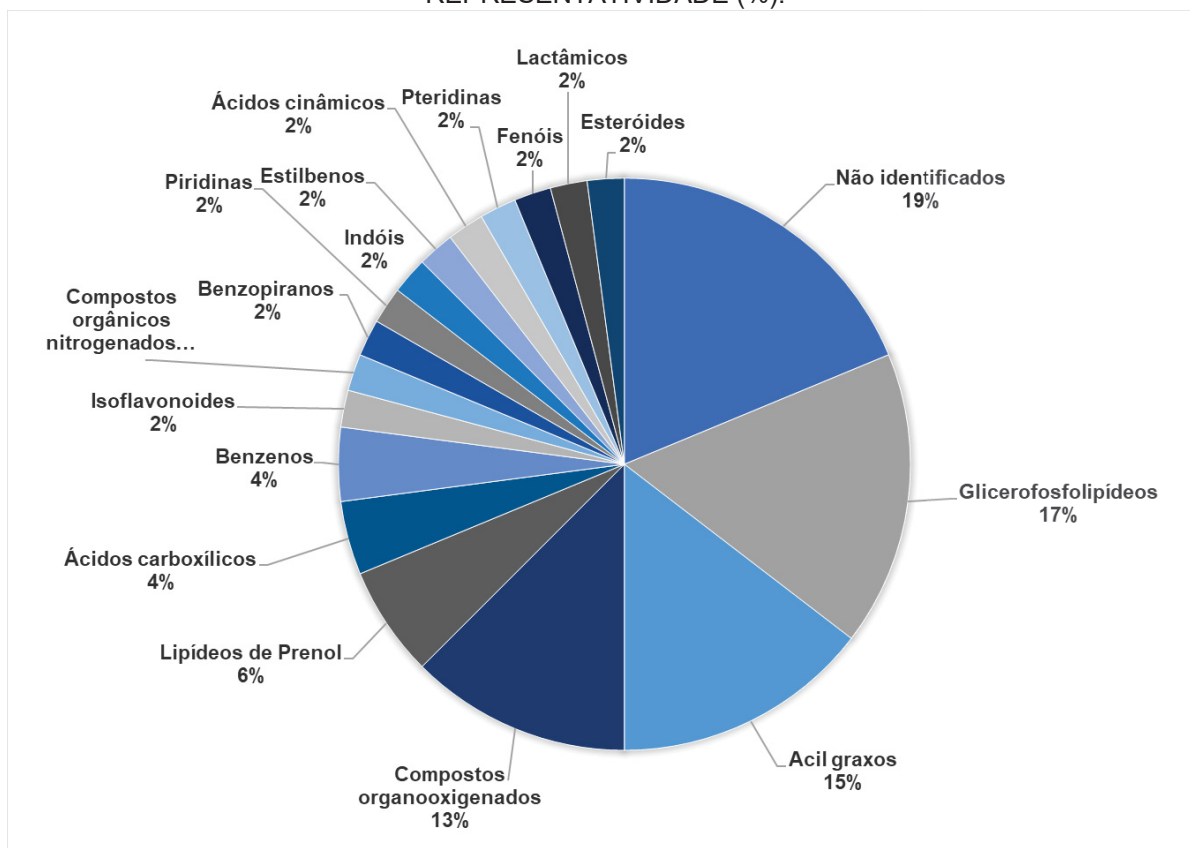
Após a ANOVA, foram identificados 123 biomarcadores no modo negativo e 83 no modo positivo, dos quais 48 foram selecionados para a realização de MS/MS por estarem presentes apenas no consórcio. Os metabólitos selecionados foram submetidos à fragmentação e análise *in silico* para possível identificação.

Foram identificadas dezessete classes pertencentes ao consórcio (FIGURA 5). A classe mais representativa foi a dos Glicerofosfolipídios (17%), seguida pelos Acil-graxos (15%) e Compostos orgânicos oxigenados (13%), as demais classes apresentaram uma representatividade entre 6 e 2%. Além disso, não foi possível a identificação de 19% dos metabólitos estudados, por falta de correlação com o banco de dados.

Dentro destas classes estão distribuídos os 48 metabólitos (TABELA 4), destes, 39 foram identificados com diferentes similaridades sendo 14 com similaridade acima de 90% (FIGURA 6), e 9 não apresentaram similaridade com nenhum metabólito do banco (ND).



FIGURA 5 - CLASSES DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS NO CONSÓRCIO E SUA REPRESENTATIVIDADE (%).



FONTE: A autora (2021)

TABELA 4. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS PRESENTES NO CONSÓRCIO. CONTINUA.

TR (min)	<i>m/z</i>	Classe	Metabólito	ESI	Cód. HMDB	ID
1.488384	232.1442	PI	Rotundina A	(+)	HMDB0035271	97%
2.86938	645.3207	LP	Lyciumoside VIII	(-)	HMDB0033210	70%
2.922048	425.1385	COM	Azinsulfurom	(+)	HMDB0033145	84%
3.281148	308.1483	BP	5-Amino-2,3-di-hidro-6- (3-hidroxi-4-metoxi-1-oxobutil) -2,2-dimetil-4H-1-benzopiran-4-ona	(+)	HMDB0038582	77%
3.33792	586.3051	ACB	2-amino-4 - ({1 - [(carboximetil) -C-hidroxicarbonimidoil] -2 - [(2-hidroxi-5-oxo-1,7-difenilhept-3-en-1-il) sulfanil] etil} Ácido -C-hidroxicarbonimidoil) butanóico	(+)	HMDB0133930	60%
3.420684	466.2249	EB	(E)-Squamosamida	(+)	HMDB0041088	87%
3.543804	525.216	LP	Phaseolus e	(-)	HMDB0035039	100%
3.781152	461.1647	COOx	Verbascoside	(-)	HMDB0039233	66%
4.260636	573.2097	PT	Tetrahidrofolil-[Glu](2)	(-)	HMDB0006825	80%
4.402908	500.2827	GFL	LPE(20:5)	(+)	HMDB0011519	64%
4.927536	681.291	COOx	Vomifoliol-glu-xil-glu	(+)	HMDB0038449	71%
4.951476	250.143	IND	Radical melatonina	(+)	HMDB0060070	81%
5.235336	515.1106	COOx	Ácido 1,4-Di-O-cafeoilquínico	(-)	HMDB0034766	100%

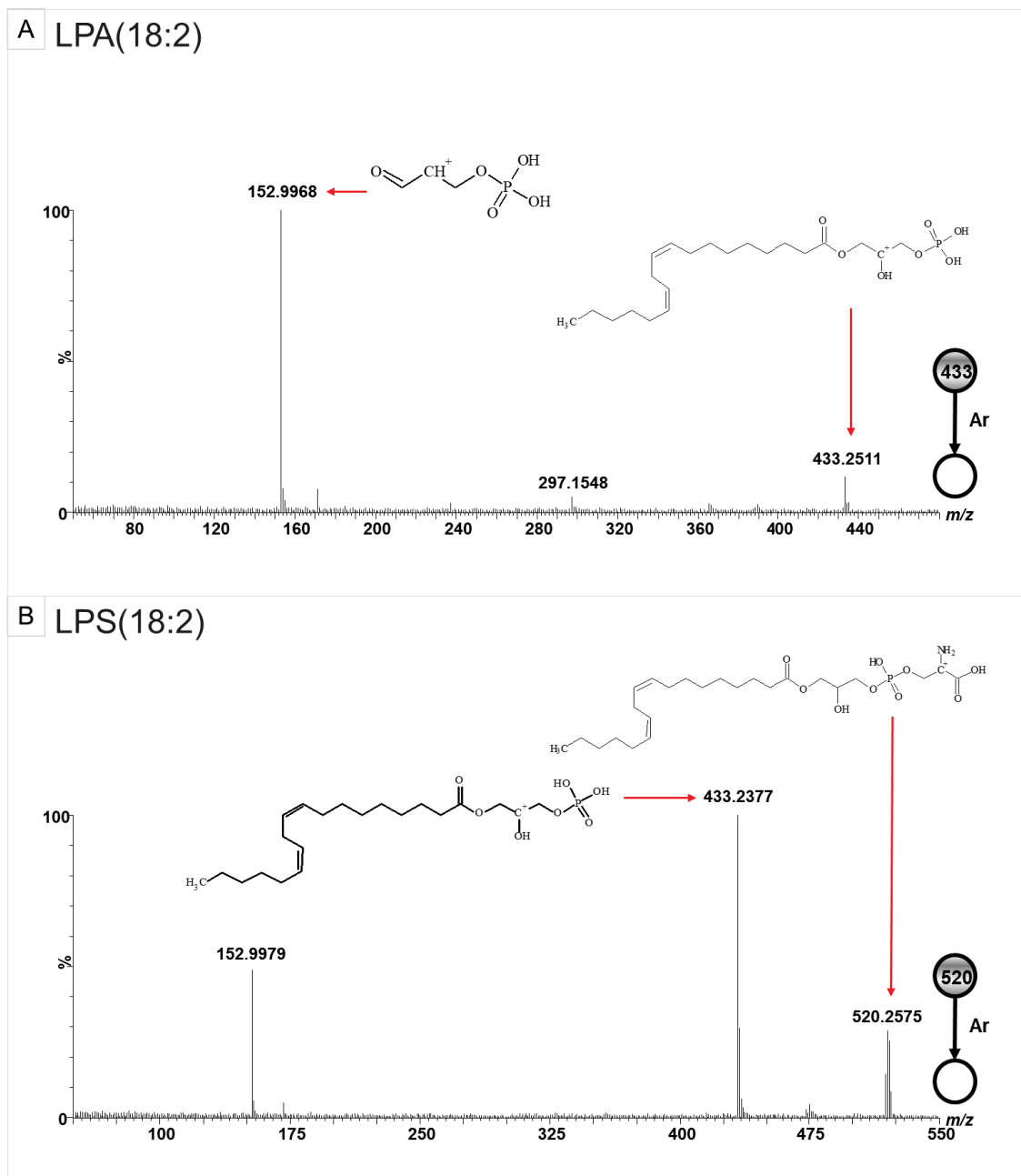
TABELA 4. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS PRESENTES NO CONSÓRCIO. CONCLUSÃO.

TR (min)	m/z	Classe	Metabólito	ESI	Cód. HMDB	ID
5.57118	1065.396	FE	TR-Saponina C	(-)	HMDB0035343	34%
5.732604	466.2853	ACB	N-Araquidonoil Tirosina	(-)	HMDB0062331	91%
5.796216	407.1627	BEM	Tansulosina	(-)	HMDB0014844	97%
5.951484	229.1222	COOx	Talaromicina A	(-)	HMDB0030143	62%
6.394032	439.1608	ISSO	Licorisoflavana A	(+)	HMDB0034184	68%
7.792812	331.2396	AC	[10]-Dehidroshogaol	(+)	HMDB0033126	95%
7.969968	212.1264	COOx	2- (2,6-dihidroxi-3,4-dimetoxiciclohexilideno) acetonitrila	(-)	HMDB0125517	96%
8.014428	346.1628	LA	Cefalexina	(-)	HMDB0014707	82%
8.065728	329.2285	AG	9,10,13-TriHOME	(-)	HMDB0004710	93%
8.513064	857.3761	EST	Olitoriusin	(-)	HMDB0039542	62%
8.705952	894.44	GFL	PE(11D5/13M5)	(+)	HMDB0061487	64%
9.232632	625.461	AG	FAHFA(22:6/13-O-18:2)	(-)	HMDB0112170	80%
9.238788	313.2306	AG	Ácido 8(R)-Hidroperoxilinoleico	(+)	HMDB0004706	94%
9.2682	632.3954	GFL	PE(28:2)	(+)	HMDB0008855	43%
9.651924	313.2345	AG	12,13-DiHOME	(-)	HMDB0004705	89%
10.09926	817.3659	GFL	PG(40:8)	(-)	HMDB0010672	86%
10.10473	409.1714	BEM	Tansulosina	(+)	HMDB0014844	92%
10.89612	311.2181	AG	Ácido 8(R)-Hidroperoxilinoleico	(-)	HMDB0004706	85%
10.90843	335.2132	AG	Prostaglandina J2	(+)	HMDB0002710	93%
11.36876	520.2665	GFL	LPS(18:2)	(-)	HMDB0240604	98%
11.64373	295.2227	AG	9(10)-EpODE	(+)	HMDB0010220	93%
11.76138	496.3358	GFL	LysoPC(16:0/0:0)	(+)	HMDB0010382	68%
12.03293	522.3517	GFL	LPS(18:2)	(+)	HMDB0240604	74%
12.10338	433.2322	GFL	LPA(18:2)	(-)	HMDB0007856	99%
12.7908	829.1768	COOx	Sesaminol 2-O-triglucosídeo	(-)	HMDB0041775	45%
12.96385	529.279	LP	Cavipetina A	(-)	HMDB0030363	74%
3.578688	304.0451	ND	ND	(-)	ND	ND
4.953528	1031.23	ND	ND	(-)	ND	ND
5.387184	187.0942	ND	ND	(-)	ND	ND
6.393348	401.2116	ND	ND	(+)	ND	ND
6.415236	515.1127	ND	ND	(-)	ND	ND
7.073244	187.1297	ND	ND	(-)	ND	ND
12.39408	295.2232	ND	ND	(-)	ND	ND
12.41939	765.1666	ND	ND	(-)	ND	ND
12.96522	986.5867	ND	ND	(+)	ND	ND

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: TR: Tempo de retenção; m/z: massa/carga; ESI: modo de ionização por *electrospray*; Cód. HMDB: código no *Human Metabolome Database*; ID: similaridade; GFL: Glicerofosfolipídios; COOx: Compostos orgânicos oxigenados; AG: Acil-graxos; LP: Lipídios de Prenol; BEN: Benzenos; ACB: Ácidos Carboxílicos e derivados; PI: Piridinas e derivados; AC: Ácido Cinâmico e derivados; EB: Estilbenzeno; CON: Compostos Orgânicos Nitrogenados; LA: Lactâmicos; IND: Indóis e derivados; PT: Pteridinas e derivados; BP: Benzopiranos; ISO: Isoflavonoides; EST: Esteróides e derivados; FE: Fenóis; FLA: Flavonoides; ND: Não identificado.

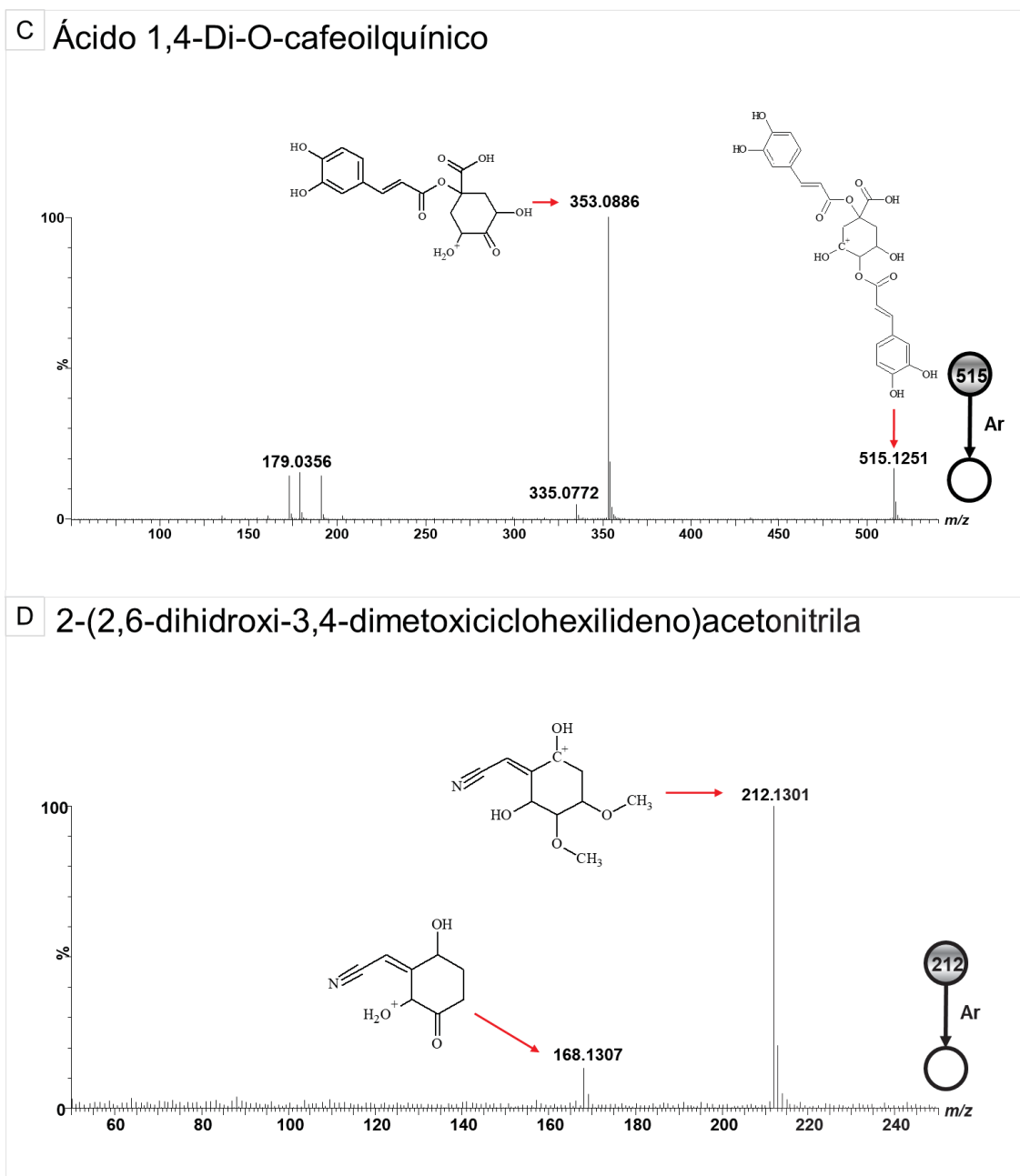
FIGURA 6 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NO CONSÓRCIO. CONTINUA.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: A)  $[M-H]^-$  de LPA(18:2) ( $m/z$  433) pertencente à classe dos Glicerofosfolipídios;  
 B)  $[M-H]^-$  de LPS(18:2) ( $m/z$  520) pertencente à classe dos Glicerofosfolipídios.

FIGURA 6 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.

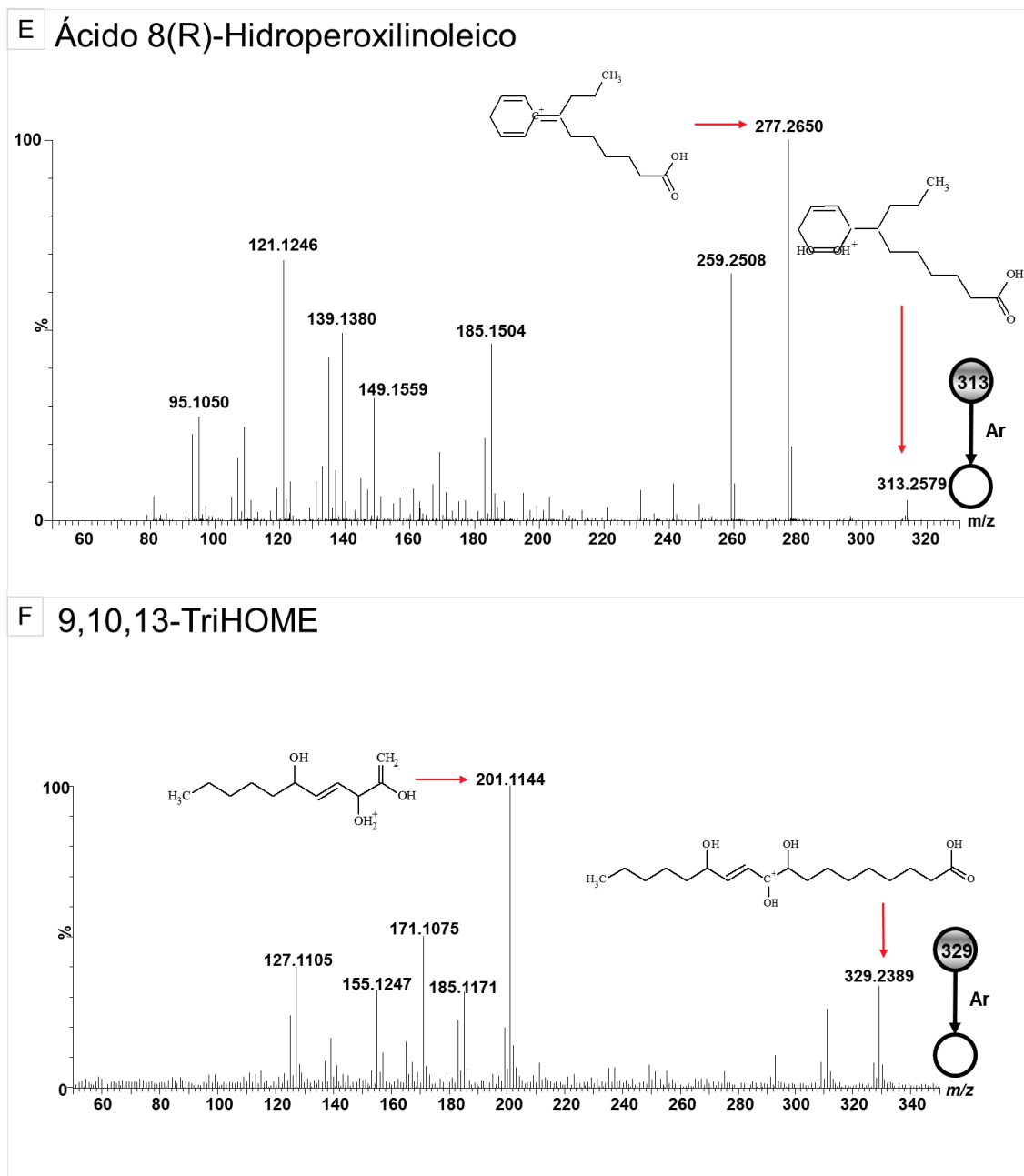


FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: C)  $[M-H]^-$  de Ácido 1,4-Di-O-cafeoilquínico ( $m/z$  515) pertencente à classe dos Compostos organooxigenados;

D)  $[M-H]^-$  de 2-(2,6-dihidroxi-3,4-dimetoxiciclohexilideno)acetonitrila ( $m/z$  212) pertencente à classe dos Compostos organooxigenados

FIGURA 6 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.

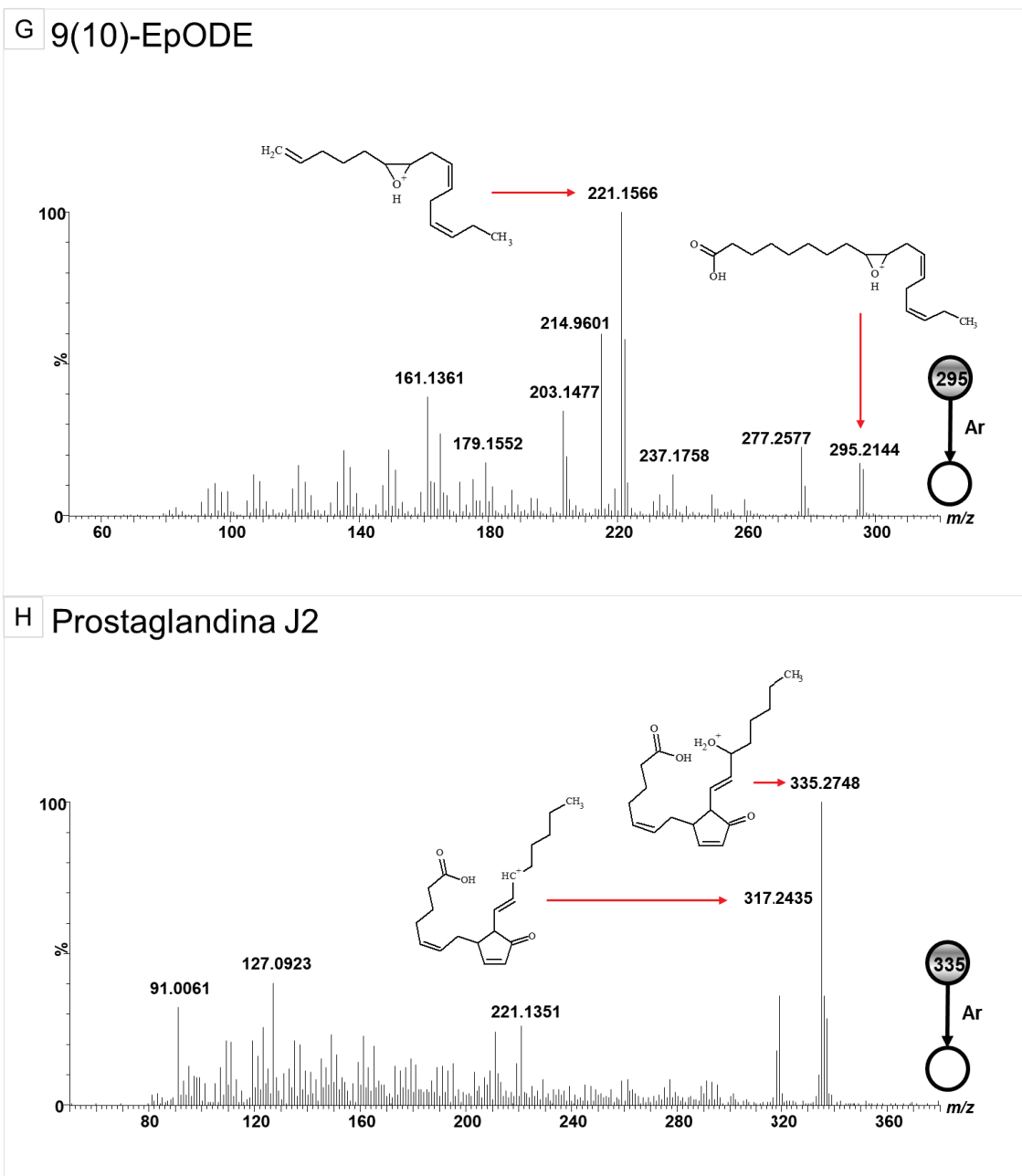


FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: E)  $[M+H]^+$  de Ácido 8(R)-Hidroperoxilinoico ( $m/z$  313) pertencente à classe dos Acil graxos;

F)  $[M-H]^-$  de 9,10,13-TriHOME ( $m/z$  329) pertencente à classe dos Acil graxos.

FIGURA 6 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.

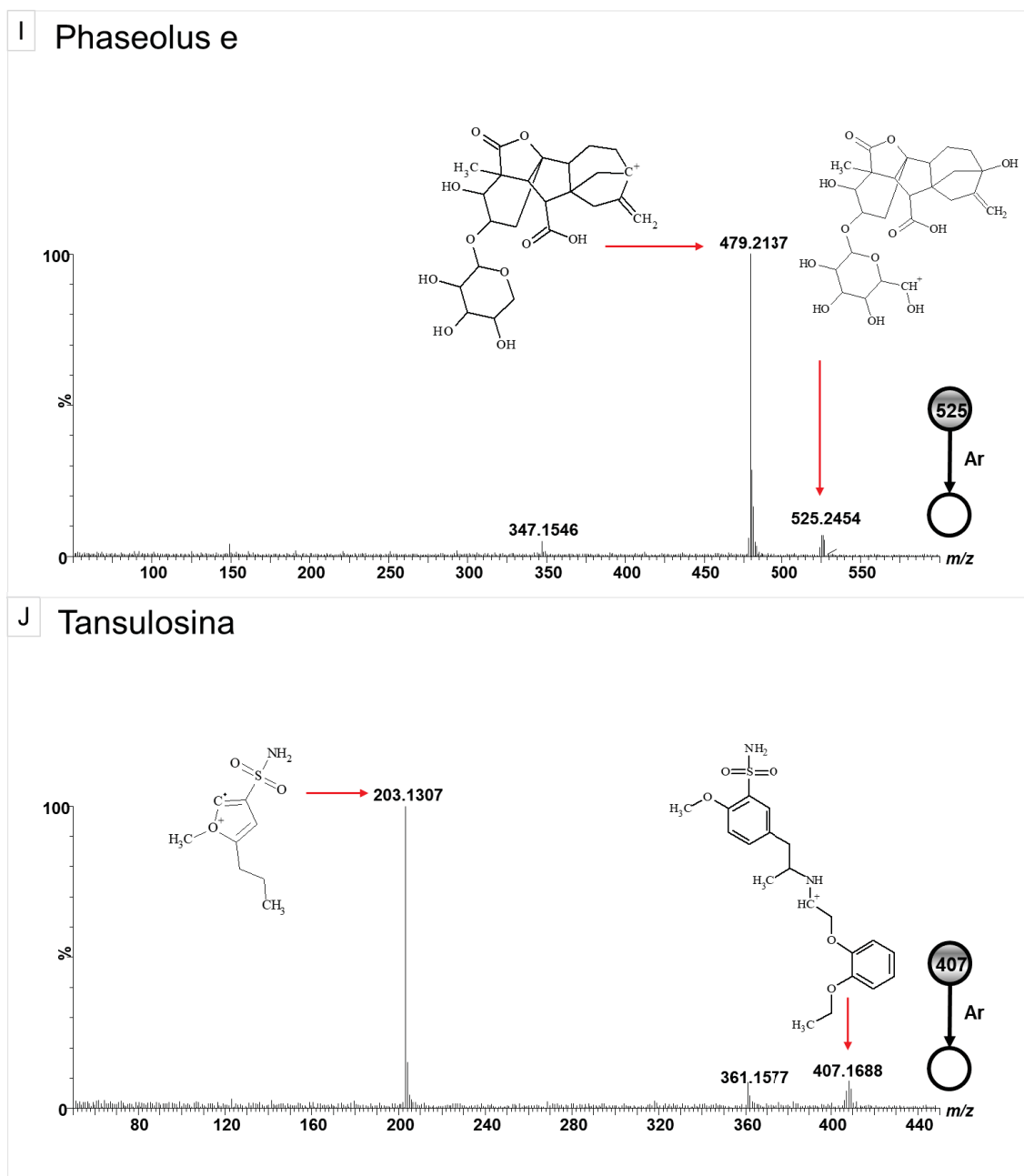


FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: G)  $[M+H]^+$  de 9(10)-EpODE ( $m/z$  295) pertencente à classe dos Ácidos graxos;

F)  $[M+H]^+$  de Prostaglandina J2 ( $m/z$  335) pertencente à classe dos Ácidos graxos.

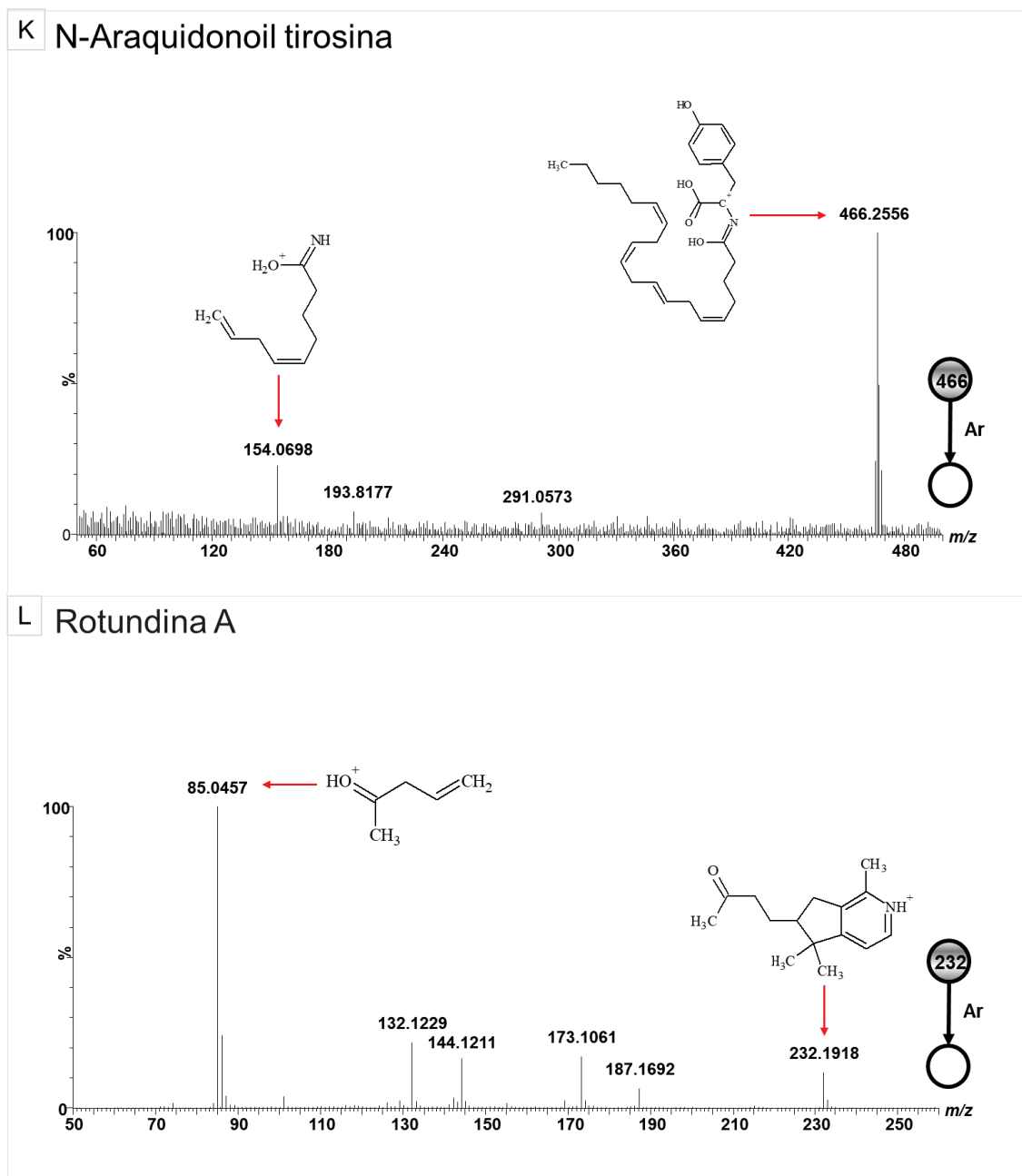
FIGURA 6 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: I)  $[M-H]^-$  de Phaseolus e ( $m/z$  525) pertencente a classe dos Lipídios de Prenol;  
 J)  $[M-H]^-$  de Tansulosina ( $m/z$  407) pertencente a classe dos Lipídios de Prenol.

FIGURA 6 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.



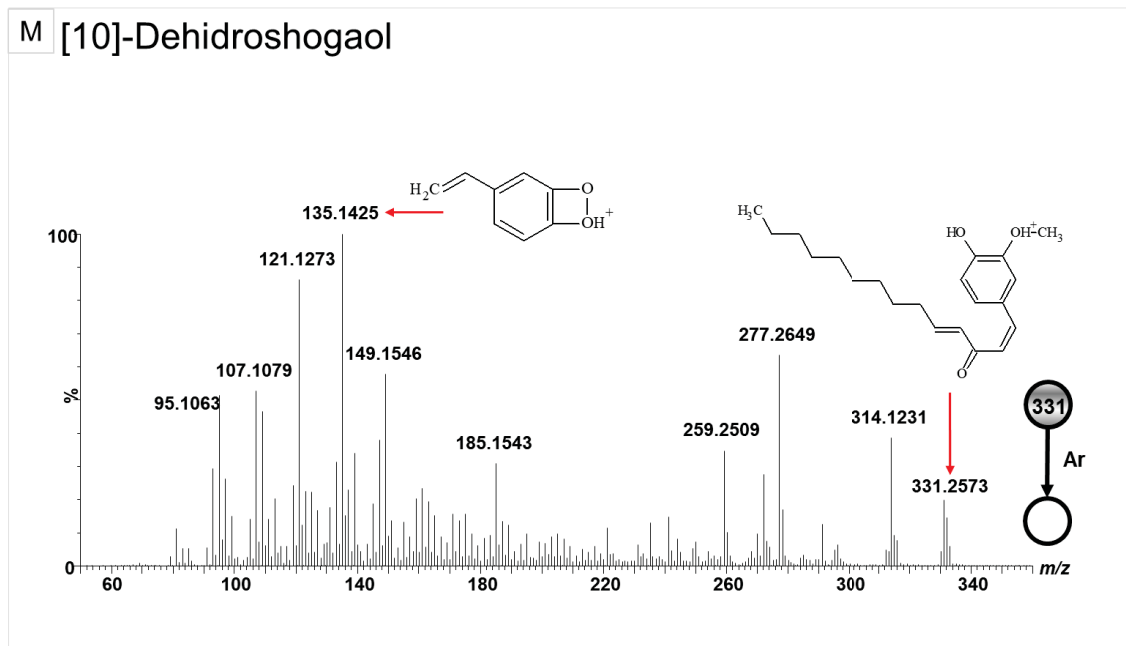
FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: K)  $[M-H]^-$  DE N-Araquidonoil tirosina ( $m/z$  466) pertencente à classe dos Ácidos carboxílicos;

L)  $[M+H]^+$  de Rotundina A ( $m/z$  232) pertencente à classe das Piridinas.



FIGURA 6 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NO CONSÓRCIO. CONCLUSÃO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: M)  $[M+H]^+$  de [10]-Dehidroshogaol ( $m/z$  331) pertencente á classe dos Ácidos cinâmicos.

## 4 DISCUSSÃO

Muitos organismos envolvidos no controle biológico de pragas e doenças têm sido avaliados, buscando um melhor entendimento e otimização do processo (CRESPO et al., 2008; LIARZI et al., 2016; CANFORA et al., 2017; OLOMBRADA et al., 2017; WU et al., 2017). Recentemente, nosso grupo de estudos constatou que, ao inocular conjuntamente duas linhagens diferentes de *B. bassiana* (Bov 3 e Bov 2), em lagartas de *D. fovealis*, a mortalidade do inseto era consideravelmente elevada (STUART et al., 2020). Além disso, ao cultivar conjuntamente estes fungos, houve um aumento na produção de várias enzimas importantes no processo de controle biológico, como quitinase e celulase, por exemplo. O presente trabalho buscou avaliar as alterações metabólicas causadas pela formação de um consórcio com as linhagens Bov3 e Bov2, de modo a associar essa mudança ao aumento na mortalidade observada em *D. fovealis*.

Um dos principais mecanismos de defesa de insetos contra o ataque de fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana*, é a formação de moléculas oxidativas como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS) (LU e LEGER, 2016; QU e WANG, 2018). Essas moléculas oxidativas tem potencial para danificar componentes celulares importantes como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Assim sendo, a produção de moléculas antioxidantes por parte destes fungos é de extrema importância para conseguir driblar o sistema imune do hospedeiro e instalar a infecção (ORTIZ-URQUIZA e KEYHANI, 2015; ZHANG et al., 2016).

No presente trabalho, após análise de metabolômica do consórcio através de GC-MS e LC-MS/MS, várias moléculas com ação antioxidante foram identificadas. A xantina é um importante exemplo de metabólito produzido pelo consórcio com tal ação. Essa molécula é um carotenoide e, como natural desta classe de metabólitos, possui atividade altamente antioxidante. Os carotenoides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza e sua produção por parte dos fungos está relacionada à virulência fúngica, como ocorre comumente com outros pigmentos fúngicos, como a melanina, por exemplo (SANJAY, 2009). A molécula L-Homocisteína, por sua vez, participa da via metabólica da cisteína e metionina (TABELA 3). Essa via é controlada em resposta a variações ambientais, devido à sua enorme importância na fisiologia celular e, proteínas derivadas dessa via metabólica, como a tioredoxina e a glutathione,

desempenham papel central na proteção celular contra o estresse oxidativo (GUÉDON e MARTÍN-VERSTREAETE, 2006; HELL e WIRTZ, 2011; ORTIZ-URQUIZA e KEYHANI, 2015; TAHIR e DIJKWELL, 2016; GAI et al., 2021). Estas moléculas são essenciais para a manutenção da homeostase celular, atuando na detoxificação das ROS, bem como moléculas de oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, ânions superóxido e radicais hidroxila. Além da ação antioxidante, a glutatona atua na modulação do sistema imune, regulação do ciclo celular, crescimento vegetativo, formação de conídios e virulência em fungos como *C. albicans*, *Alternaria brassicola* e *B. bassiana* (CALMES et al., 2015.; TILLMAN et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

Além da xantina e da L-Homocisteína, outras moléculas com potencial antioxidante foram detectadas no consórcio como o Ácido etanimídico, que atua impedindo a peroxidação lipídica e restaurando a homeostase celular (ERUKAINUR et al., 2017; ROTARU et al., 2018; NICOLAESCU, VARUT e PATRUNA, 2019). O metabólito [10]-Dehydroshogaol que, além de sua potente atividade antioxidante, já foi relacionado à atividade inseticida contra *Spilosoma obliqua* (AGARWAL et al., 2001). E o monossacarídeo D-manose, que demonstra potente ação contra radicais hidroxila, ânions superóxido e radicais 1,1-dihpenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (SUN et al., 2009; HE et al., 2012), além de constituir uma excelente fonte de carbono para crescimento e esporulação fúngicos (SUN e LIU, 2006). A parede celular de fungos é rica em manose, principalmente durante a infecção, e a presença desta molécula confere resistência ao estresse, causado pelo sistema imune do hospedeiro, da mesma forma está diretamente relacionada à formação de biofilmes e comunicação celular entre diferentes patógenos e pode servir como “barreira protetora” em ambientes hostis (ABEYRATNE-PERERA e CHANDRAN, 2017). D-manose é também precursora de manitol, um dos mais importantes polióis encontrado em fungos, que atua no armazenamento e translocação de carboidratos, na germinação de conídios em situações de estresse, resistência a estresse osmótico e como antioxidante (SOLOMON et al., 2006; MEENA et al., 2015). Em *B. bassiana*, a deleção do gene Sur7, relacionado à tolerância ao estresse, desenvolvimento fúngico e virulência, levou à redução da produção de manitol e conseqüente aumento de susceptibilidade ao estresse-oxidativo e redução de esporulação, demonstrando a importância desta molécula na patogênese fúngica (ZHANG et al., 2021).

A produção de xantina, L-Homocisteína, D-manose, Ácido Etanimídico e do Dehydroshogaol por parte do consórcio provavelmente está relacionada à situação de estresse que ocorre devido ao co-cultivo de Bov 2 e Bov 3, o que induz a produção de metabólitos de “defesa”. Portanto, os metabólitos antioxidantes descritos neste trabalho podem atuar expressamente na inibição das moléculas oxidativas, protegendo então o patógeno (neste caso o consórcio) do sistema imune do inseto durante uma possível infecção.

A análise de enriquecimento demonstrou que os metabólitos identificados no consórcio, adenosina-5'-monofosfato (AMP) e xantina possuem papel importante na ativação da via metabólica de purinas (TABELA 3). Em fungos, essa classe de moléculas possui inúmeras funções que vão desde a síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), ao metabolismo energético - através da síntese das principais moléculas de armazenamento de energia (ATP e GTP) -, como também na sinalização celular através da produção de AMP e GMP cíclicos, e cofatores como NADH, NADPH e coenzima A (CHITRAKAR et al., 2017; CHITTY e FRASER, 2017). A degradação das purinas para obtenção de nitrogênio é comumente praticada uma vez que esse elemento é essencial para a sobrevivência e desenvolvimento fúngico. Essa prática já foi relacionada à virulência fúngica em *Candida albicans*, por exemplo, onde a utilização das purinas como fonte de nitrogênio demonstrou ser essencial para a produção de fatores de virulência como aderência ao tecido do hospedeiro e morfogênese de hifas (VYLKOVA e LORENZ, 2017). Além disso, a deleção de genes relacionados à via *de novo* da biossíntese de purinas resultou em redução expressiva ou completa inibição da virulência em *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* e *Magnaporthe oryzae* (PERFECT, TOFFALETTI e RUDE, 1993; DONOVAN et al., 2001; RODRIGUEZ-SUARES et al., 2007; YANG et al., 2019).

O aumento nos níveis de AMP induz a formação de AMP cíclico (cAMP) e ativa expressão de AMP-proteína quinase ativada (AMPK). cAMP atua na sinalização celular, crescimento vegetativo, formação de apressório, manutenção da integridade da parede celular e patogenicidade em fungos. cAMP está também relacionado à ativação da via de biossíntese das purinas e a deleção de proteínas de membrana e enzimas que interagem com esta molécula, provocou drástica redução no crescimento, mudanças morfológicas e perda de virulência no fungo fitopatogênico *Magnaporthe oryzae* (YANG et al., 2019). AMPK, por sua vez, exerce atividade anti-

inflamatória, atuando diretamente na supressão de vias como PI3K/Akt e JAK/STAT, que estão diretamente relacionadas com a ativação imune em insetos (SAG et al., 2008; MYLLYMÄKI e RAMËT, 2014; ZHU et al., 2015; RUTHERFORD et al., 2016; BANG, 2019). Do mesmo modo, o metabólito anti-inflamatório e antioxidante ácido 1,4-Di-O-cafeoilquínico (DiOc). DiOc possui importante capacidade anti-inflamatória *in vitro*, inibindo diversas moléculas e células participantes da reação inflamatória (PELUSO et al., 1995; HUNG et al., 2006). Um estudo desenvolvido em Taiwan por Chiou, Chen e Wei (2011) demonstra que os ácidos cafeoilquínicos (CA) apresentam capacidade inibitória da migração celular e antiproliferativa mediadas pela supressão das vias de JNK e PI3K/Akt, interferindo então na resposta inflamatória. Além disso, estudos prévios do mesmo grupo mostram que CAs também são capazes de inibir o estresse oxidativo provocado por radicais livres no sítio inflamatório, atuando também como antioxidante (CHEN et al., 2007). Esses dados corroboram com o descrito por Peluso e colaboradores (1995) que perceberam a ação anti-inflamatória de diferentes CAs, pela inibição da migração celular e da secreção de ânions superóxido ( $O_2^-$ ) *in vitro*. Uma vez que a migração celular está inibida, bem como a secreção de  $O_2^-$ , a resposta inflamatória e o estresse oxidativo ficam fatalmente prejudicados. A produção de CAs e seu potencial antioxidante já foram descritos em fungos endofíticos isolados de plantas medicinais (HUANG et al., 2006).

O sistema imune de insetos é extremamente similar ao de humanos, devido à conservação evolutiva de muitas vias sinalizadoras e moléculas reguladoras chave (BUCHON, SILVERMAN e CHERY, 2014). Em insetos, a imunidade inata é mediada por diversas células e moléculas efetoras, tais quais antimicrobianas, sinalizadoras, oxidantes como ROS, NOS e as fenolperoxidases (PPO's), que dão origem à melanina, e moléculas pró-inflamatórias, como as interleucinas. Existem diversas similaridades nas vias sinalizadoras em células humanas e de insetos para ativar o sistema imune inato. Em ambos os casos, a infecção por patógenos leva à uma ativação de receptores *Toll like* (TLR), que iniciam cascatas sinalizadoras intracelulares, culminando na ativação de fatores de transcrição de moléculas inflamatórias Relish, Dorsal e Dif, homólogas à NF- $\kappa$ B e vias sinalizadoras como JAK/STAT e JNK (SILVERMAN e MANIATIS, 2001; LU e LEGER, 2016; QU e WANG, 2018). As células responsáveis pela resposta imune em insetos são os hemócitos, fagócitos capazes de reconhecer o patógeno, engolfá-lo e destruí-lo, tal qual atuam regulando a expressão de moléculas antimicrobianas (MAM's) e induzidos pela

expressão dos genes homólogos de NF- $\kappa$ B; e as células cristal, responsáveis pela melanização da hemolinfa através da produção de PPO's (LU e LEGER, 2016). Portanto, moléculas produzidas por fungos entomopatogênicos, que possuem atividade anti-inflamatória, podem atuar na supressão de células e genes pró-inflamatórios em insetos, inibindo as ações do sistema imune e aumentando sua virulência.

Outras moléculas identificadas no consórcio e que possuem potencial anti-inflamatório são a Prostaglandina J2 (PGJ2) e o endocanabinóide N-araquidonoil tirosina (TABELA 4).

A produção de prostaglandinas é amplamente descrita em fungos patogênicos como *A. fumigatus*, *Tricophyton rubrum*, e leveduras como *C. albicans*, *C. neoformans* e *Hystoplasma capsulatum*. Acredita-se que, nesta classe de fungos, estes eicosanóides estejam diretamente relacionadas à sua patogenicidade, devido à capacidade destas moléculas em suprimir a resposta imune do hospedeiro (NOVERR, TOEWS e HUFFNAGLE, 2002; RHOME e POETA, 2009). Noverr e colaboradores (2002) explicam que a produção de prostaglandinas por fungos patogênicos reduz a produção de TNF- $\alpha$  - uma importante molécula sinalizadora da cascata inflamatória -, e também induzir a produção de IL-10, provocando uma redução na resposta inflamatória aguda, favorecendo então uma infecção fúngica crônica. PGJ2 atua através da sua metabolização em 15-Deoxy-D12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2). 15d-PGJ2 possui alta afinidade pelo receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) e, ao ligar-se a este receptor, inibe diversos genes relacionados à cascata inflamatória, como por exemplo o gene de NF- $\kappa$ B. Esta supressão gênica, leva então à uma ação anti-inflamatória severa (STRAUS et al., 2000; SCHER e PILLINGER, 2005), além de possuir ação citotóxica, citostática e apoptótica (LEVONEN et al., 2001). Em insetos os receptores *Ecdysone-75* e *78* (E75 e E78) são homólogos de PPAR $\gamma$  e sua homologia funcional já foi comprovada em estudos farmacológicos prévios (ESCRIVA et al., 1997; KING-JONES e THUMMEL, 2005; JORDAN et al., 2015; ZIPPER et al., 2020). Além disso, 15d-PGJ2 também pode atuar de forma independente de PPAR $\gamma$ , inibindo NF- $\kappa$ B através da inibição de I $\kappa$ B quinase, ainda assim inibindo a cascata inflamatória (LEVONEN et al., 2001). A ação de 15d-PGJ2 em insetos foi demonstrada por Yun et al. (2018). Desta forma, podemos assumir que PGJ2 produzida pelo consórcio, após metabolizada, seria capaz de ligar-se aos receptores E75 e E78, bem como atuar de forma independente, induzindo apoptose e

inibição da cascata inflamatória do inseto, desencadeada pela infecção fúngica, facilitando a instalação da infecção e aumentando sua patogenicidade.

Os endocanabinóides, como a molécula produzida pelo consórcio: N-araquidonoil tirosina, são, por sua vez, produtos endógenos capazes de regular diversas fases do processo inflamatório, como a adesão celular, tônus vascular e expressão de diversas moléculas envolvidas neste processo. O N-araquidonoil tirosina é um precursor do N-Araquidonoil DOPA (NADA), o qual tem sido amplamente estudado por seu efeito anti-inflamatório. NADA é agonista dos receptores TLR 2 e TLR 4 e atua diretamente na redução do recrutamento de células endoteliais. Os receptores TLR2 e TLR4 são ativados por moléculas microbianas e por TNF- $\alpha$  que, ao ligar-se à estas moléculas, desencadeiam uma cascata imunológica dando origem à diversas citocinas de comunicação e recrutamento celular. Quando NADA se liga aos receptores, a cascata é então inibida, prejudicando a reação inflamatória (LAWTON, 2017). NADA também possui afinidade pelo receptor de PPAR $\gamma$ , bloqueando este receptor e atuando como agente anti-inflamatório também por esta via (GRABIEC e DEHGhani, 2017).

As atividades antioxidante e anti-inflamatória das moléculas produzidas pelo consórcio podem estar diretamente associadas à maior mortalidade das lagartas de *D. fovealis*, observada em estudos prévios do nosso grupo (STUART et al., 2020), uma vez que ambas favorecem a infecção, aumentando assim a virulência fúngica.

Nosso trabalho evidencia que a via metabólica das pirimidinas também está ativada no consórcio (FIGURA 3) e, assim como as purinas, possui papel de extrema importância em diversos processos celulares, atuando na síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), síntese de polissacarídeos, glicoproteínas e fosfolípidios. Além disso, exercem importante ação na síntese de lipídios de membrana e na produção de moléculas intermediárias da comunicação celular. Esta via é representada pela molécula uridina-5'-monofosfato (UMP) (TABELA 3), uma das mais importantes da via e precursora de todos os nucleotídeos pirimídicos (LEVINE, HOOGENRAAD e KRETCHMER, 1974; KAFER et al., 2004).

Assim como a via das pirimidinas está relacionada à síntese de lipídios de membrana, a via metabólica de síntese de fosfolípidios também está ativada no consórcio e é representada pelo metabólito glicerol-3-fosfato (G3P) (TABELA 3). Ela é responsável para síntese dos glicerofosfolípidios de membrana, que foi, de todos os metabólitos identificados por LC-MS/MS no consórcio, a classe mais representativa

(17% - FIGURA 5). Metabólitos identificados como LPA (ácido lisofosfatídico), LPS (Lisofosfatidil serina) e LysoPC (Lisofosfatidil colina) por exemplo, são pertencentes à essa classe (TABELA 4). Além de constituintes de membrana, a sinalização celular é uma das principais funções de LPA, LPS e LysoPC, que atuam como mediadores lipídicos com atividades semelhantes à fatores de crescimento, controlando apoptose e diferenciação celular (HMDB), além de estar relacionados à virulência em fungos (LIPID WEB). O LPA participa da síntese de gotas lipídicas, que atua na resposta ao estresse, e sua ação na virulência fúngica está relacionada, dentre outros aspectos, à viabilidade de conídios, formação de estruturas de infecção (como apressório e blastosporos), penetração e proliferação dentro do inseto (RUDGE et al., 2004; KEYHANI et al., 2018). Os glicerofosfolipídios são também importante fonte de energia, podendo atuar como reservatório energético (KERWIN, TUININGA e ERICSSON, 1994; BECCACCIOLI, REVERBERI e SCALA, 2019).

A segunda classe mais representativa no consórcio foi a dos Acil-graxos (15% - FIGURA 5). Esta classe está representada por quatro metabólitos: 8(R)-Ácido hidroperoxilinoico (8(R)-HPODE), 9,10,13-TriHOME, 9(10)-EpODE e Prostaglandina J2. Os acil-graxos são o principal componente dos lipídios complexos e, portanto, é uma das classes de lipídios biológicos mais relevantes (LIPID WEB). Os metabólitos acima são também conhecidos como oxilipinas e participam da via metabólica do ácido linoleico, a qual está diretamente relacionada à esporulação e germinação de esporos (CALVO, GARDNER e KELLER, 2001; GARSHA et al., 2007). As oxilipinas são derivadas dos ácidos oleico, linolênico e linoleico, encontrados principalmente nos glicerofosfolipídios e atuam como reguladores do crescimento fúngico, na diferenciação e apoptose celular e no desenvolvimento do processo infeccioso em fungos patogênicos. Sua produção está diretamente relacionada à sua adaptabilidade frente a mudanças ambientais, muitas vezes induzida por estresse oxidativo e presença de radicais livres. Ademais, podem se comportar como “*hormone-like*”, sinalizando e modulando a produção de toxinas, reprodução fúngica através do equilíbrio entre esporulação assexuada e sexuada (TSITSIGIANNIS e KELLER, 2007) e patogenicidade de fungos (BRODOWSKI e OLIW, 1993). Assim sendo, as oxilipinas podem estar relacionadas com a reprodução sexuada no consórcio, uma vez que se trata da junção de duas linhagens diferentes de *B. bassiana*, sugerindo a presença de heterotalismo.

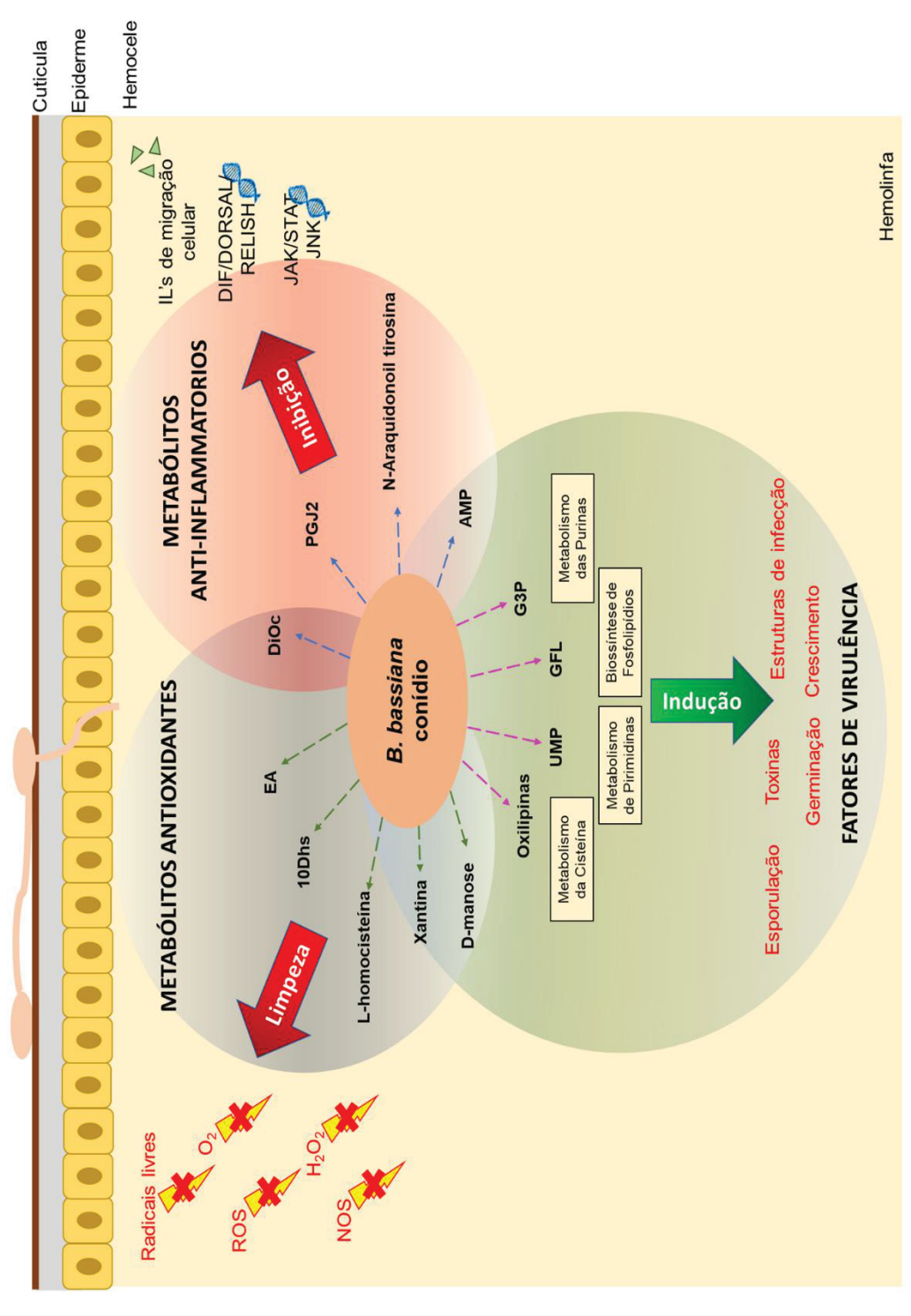


No consórcio, os glicerofosfolípídios e de acil-graxos podem atuar como fatores de virulência, uma vez que estão diretamente relacionados à viabilidade celular, formação de apressório e blastóporos, esporulação, germinação e produção de toxinas, que são premissas para a virulência de fungos entomopatogênicos (KHACHATOURIANS e QAZI, 2006; ORTIZ-URQUIZA e KEYHANI, 2013; QU e WANG, 2018).

## 5 CONCLUSÃO

Após análise de metabolômica, foram detectados 21 biomarcadores no consórcio. As moléculas encontradas possuem principalmente ação antioxidante e anti-inflamatória, podendo atuar na supressão do sistema imune do inseto. Em consequência, ocorre o aumento da virulência e patogenicidade fúngicas, o que pode levar a maior eficácia do consorcio no controle biológico, observado nos trabalhos prévios do nosso grupo. Além disso, ações como produção de toxinas, indução de crescimento vegetativo, indução de germinação, esporulação e formação de estruturas de infecção também foram identificadas nos metabólitos produzidos pelo consórcio, demonstrando sua ampla atuação no aumento da virulência do consórcio (FIGURA 7). Todos os dados encontrados corroboram que o crescimento conjunto de diferentes linhagens de *B. bassiana*, para a formação de um consorcio, implicam positivamente na produção de moléculas que potencializam sua letalidade frente seu uso individual, sendo assim uma excelente opção para uso na agricultura. Mais estudos devem ser realizados para avaliar o modo de atuação diretamente no inseto.

FIGURA 7. HIPÓTESE DA ATUAÇÃO DOS METABÓLITOS PRODUZIDOS PELO CONSÓRCIO SOBRE O SISTEMA IMUNE DE *Duponchelia fovealis*.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: IL's: interleucinas; DiOc: Ácido 1,4-Di-O-cafeoilquínico; PGJ2: Prostaglandina J2; AMP: Adenosina-5'-monofosfato; G3P: Glicerol-3-fosfato; GFL: Glicerofosfolípidios; UMP: Uridina-5'-monofosfato; 10Dhs: [10]-Dehidroshogaol; EA: Ácido etanimídico; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânions superóxido; ROS: Espécies reativas de oxigênio; NOS: espécies reativas de nitrogênio; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio.

## REFERÊNCIAS

ABEYRATNE-PERERA, H. K.; CHANDRAN, P. L. Mannose surfaces exhibit self-latching, water-structuring, and resilience to chaotropes: implications for pathogen virulence. *Langmuir*, Washington, v. 33, n. 36, p. 9178-9189, 2017.

AGARWAL, M; WALIA, S.; DHINGRA, S.; KHAMBAY B. P. S. Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. **Pest Management Science**, New Delhi, v. 57, p. 289-300, 2001.

BANG, I. S. JAK/STAT signaling in insect innate immunity. **Entomological Research**, Asan, v. 49, p. 339-353, 2019.

BECCACCIOLI, M.; REVERBERI, M.; SCALA, V. Fungal lipids: biosynthesis and signaling during plant-pathogen interactions. **Frontiers in Bioscience**, Rome, v. 24, p. 172-185, 2019.

BRODOWSKY, I. D.; OLIW, E. H. Biosynthesis of 8R-hydroperoxylinoleic acid by the fungus *Laestisaria arvalis*. **Biochimica and Biophysica Acta**, Uppsala, v. 1168, p. 68-72, 1993.

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster* – from microbial recognition to whole-organism physiology. **Nature Reviews**, New York, v. 14, p. 797-810, 2014.

BUDZINSKI, I. G. F.; MOON, D. H.; MOROSINI, J. S.; LINDÉN, P.; BRAGATTO, J.; MORITZ, T.; LABATE, C. A. Integrated analysis of gene expression from carbon metabolism, proteome and metabolome, reveals altered primary metabolism in *Eucalyptus grandis* bark, in response to seasonal variation. **BMC Plant Biology**, Piracicaba, v. 16, n. 149, p. 1-15, 2016.

CALMES, B.; MOREL-ROUHIER, M.; BETAILLÉ-SIMONEAU, N.; GELHAYE, E.; GUILLEMETTE, T.; SIMONEAU, P. Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of *Alternaria brassicola*. **BMC Microbiology**, Angers Cedex, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2015.

CALVO, A. M.; GARDNER, H. W.; KELLER, N. P. Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. **The Journal of Biological Chemistry**, Texas, v. 276, n. 28, p. 25766-25774, 2001.

CANFORA, L.; ABU-SAMRA, N.; TARTANUS, M.; LABANOWSKA, B. H.; BENEDETTI, A.; PINZARI, F.; MALUSÀ, E. Co-inoculum of *Beauveria brongniartii* and *B. bassiana* shows *in vitro* different metabolic behavior in comparison to single inoculums. **Scientific Reports**, Roma, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

CHEN, C. C.; WEI, B. L.; LOKE, S. H.; CHIOU, W. F. 3,4-Di-O-Caffeoylquinic acid protects endothelial cells against oxidative stress and restores endothelium-dependent vasodilatation. **Journal of Chinese Medicine**, Taiwan, v. 18, n. 1-2, p. 89-100, 2007.

CHIOU, W. F.; CHEN, C. C.; WEI, B. L. 3,4-Di-O-Caffeoylquinic acid inhibits angiotensin-II-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by downregulating the JNK and PI3K/Akt signaling pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Taiwan, v. 2011, ID.634502, 2011.

CHITRAKAR, I.; KIM-HOLZAPFEL, D. M.; ZHOU, W.; FRENCH, J. B. Higher Order Structures in Purine and Pyrimidine Metabolism. **Journal of Structural Biology**, Nova York, v. 197, n. 3, p. 354-364, 2017.

CHITTY, J. L.; FRASER, J. A. Purine Acquisition and Synthesis by Human Fungal Pathogens. **Microorganisms**, Queensland, v. 5, n. 33, p. 1-16, 2017.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, Quebec, e86, v. 68, 2019.

CRESPO, R.; PEDRINI, N.; JUÁREZ, M. P.; DAL BELLO, G. M. Volatile organic compounds released by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiological Research**, La Plata, v. 163, p. 148-151, 2008.

DING, J.-L.; HOU, J.; FENG, M.-G.; YING, S.-H. Transcriptomic analysis reveal comprehensive responses of insect hemocytes to mycopathogen *Beauveria bassiana*, and fungal virulence-related cell wall protein assists pathogen to evade host cellular defense. **Virulence**, Hangzhou, v. 11, n. 1, p. 1352-1365, 2020.

DIXON, R. A.; GANG, D. R.; CHARLTON, A. J.; FIEHN, O.; KUIPER H. A.; REYNOLDS, T. L.; TJEERDEMA, R. S.; JEFFERY, E. H.; GERMAN, B.; RIDLEY, W. P.; SEIBER, J. N. Applications of metabolomics in agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oklahoma, v. 54, p. 8984-8994, 2006.

DONOVAN, M.; SCHUMUKE, J. J.; FONZI, W. A.; BONAR, S. L.; GHEESLING-MULLIS, K.; JACOB, G. S.; DAVISSON, V. J.; DOTSON, S. B. Virulence of a Phosphoribosylaminoimidazole Carboxylase-Deficient *Candida albicans* Strain in an Immunosuppressed Murine Model of Systemic Candidiasis. **Infection and Immunity**, St. Louis, v. 69, n. 4, p. 2542-2548, 2001.

ERUKAINURE, O. L.; AJIBOYE, J. A.; OKAFOR, O. Y.; OKORO, E. E.; ASIEBA, G.; SARUMI, B. B.; ADENEKAN, S. O.; ZARUWA, M. Z. Alcoholic lung injury: pineapple peel extract modulates antioxidant enzymes and attenuates lipid peroxidation in rat models. **Clinical Phytoscience**, Lagos, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2017.

ESCRIVA, H.; SAFI, R.; HÄNNI, C.; LANGLOIS, M.-C.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; STEHELIN, D.; CAPRON, A.; PIERCE, R.; LAUDET, V. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Lilli Cedex, v. 14, n. 13, p. 6803,6808, 1997.

FRAGA-CORRAL, M.; CARPENA, M.; GARCIA-OLIVEIRA, P.; PEREIRA, A. G.; PRIETO, M. A.; SIMAL-GANDARA, J. Analytical metabolomics and application in health, environmental and food science. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Bragança, p. 1-23, 2020.

GAI, Y.; LI, L.; MA, H.; RIELY, B. K.; LIU, B.; LI, H. The critical role of MetR/MetB/MetC/MetX in Cysteine and methionine metabolism, fungal development and virulence of *Alternaria alternata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Hangzhou, v. 87, n. 4, 2021.

GARSHA, U.; JERNERÉN, F.; CHUNG, D. W.; KELLER, N. P.; HAMBERG, M.; OLIW, E. H. Identification of Dioxygenases required for *Aspergillus* development. **The Journal of Biological Chemistry**, Uppsala, v. 282, n. 48, p. 34707-34718, 2007.

GIBSON, D. M.; DONZELLI, B. G. G.; KRASNOFF, S. B.; KEYHANI, N. O. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural Product Reports**, New York, v. 31, n. 10, p. 1287-1305, 2014.

GRABIEC, U.; DEGHANI, F. N-Arachidonoyl Dopamine: A novel endocannabinoid and endovanilloid with widespread physiological and pharmacological activities. **Cannabis and Cannabinoid Research**, Halle, v. 2, n. 1, p. 183-196, 2017.

GUÉDON, E.; MARTIN-VERSTRAETE, I. Cysteine Regulation and its metabolism in Bacteria. In: WENDISCH, V. F. ed. **Amino Acid Biosynthesis~ Pathways, Regulation and Metabolic Engineering**. Berlin: Springer. p. 195-218, 2006.

HE, J.-Z.; RU, Q.-M.; DONG, D.-D.; SUN, P.-L. Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water-soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. **Molecules**, Hangzhou, v. 17, n. 4, p. 4373-4387, 2012.

HE, Z.; ZHAO, X.; LU, Z.; WANG, H.; LIU, P.; ZENG, F.; ZHANG, Y. Comparative transcriptome and gene co-expression network analysis reveal genes and signaling pathway adaptively response to varied adverse stress in the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Chongqing, v. 151, p. 169-181, 2018.

HELL, R.; WIRTZ, M. Molecular Biology, Biochemistry and Cellular Physiology of Cysteine metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, Heidelberg, v. 9, 2011.

HOFFMAN, D. E.; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M. E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell and Environment**, Umea, v. 33, n. 8, p. 1298-1313, 2010.

HUANG, W.-Y.; CAI, Y.-Z.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. **Economic Botany**, Hong Kong, v. 61, n. 1, p. 14-30, 2006.

HUNG, T. M.; NA, MK.; THUONG, P. T.; SU, N. D.; SOK, DS.; SEONG, Y. H.; BAE, KH. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. **Journal of Ethnopharmacology**, Daejeon, v. 108, p. 188-192, 2006.

HMDB - THE HUMAN METABOLOME DATABASE. Canadá, 2007-2020.

JONSSON, P.; JOHANSSON, A. I.; GULLBERG, J.; TRYGG, J.; JIYE, A.; GRUNG, B.; MARKLUND, S.; SJÖRSTRÖM, M.; ANTTI, H.; MORITZ, T. High-Throughput Data Analysis for Detecting and Identifying Differences between Samples in GC/MS-Based Metabolomic Analyses. **Analytical Chemistry**, Umea, v. 77, n. 17, p. 5635-5642, 2005.

JORDAN, A.; MENZL, J.; PODOLSKY, T. C.; MANZO, E.; ESTES, P. S.; ASHFORD, S.; ZARNESCU, D. C. PPAR gamma activation is neuroprotective in a *Drosophila* model of ALS based on TDP-43. **Human Molecular Genetics**, Tucson, v. 24, n. 6, p. 1741-1754, 2015.

KAFER, C.; ZHOU, L.; SANTOSO, D.; GUIRGIS, A.; WEERS, B.; PARK, S.; THORNBURG, R. Regulation of pyrimidine metabolism in plants. **Frontiers in Bioscience**, Ames, v. 9, p. 1161-1125, 2004.

KHACHATOURIANS, G. G.; QAZI, S. S. Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and Molecular Biology. In: BRAKHAGE, A. A.; ZIPFEL, P. F. (Eds.). **Human and Animal Relationships: The Mycota VI**. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag, 2008. p. 33-61.

KELLER, N. P. Fungal Secondary Metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, Wisconsin, v. 17, p. 167-180, 2019.

KERWIN, J. L.; TUININGA, A. R.; ERICSSON, L. H. Identification of molecule species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, Seattle, v. 35, p. 1102-1114, 1994.

KEYHANI, N. O. Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi. **Fungal Biology**, Gainesville, v. 122, p. 420-429, 2018.

KING-JONES, K.; THUMMEL, C. S. Nuclear Receptors: A perspective from *Drosophila*. **Nature Reviews Genetics**, Salt Lake City, v. 6, n. 4, p. 311-323, 2005.

LAWTON, S. K. **Immune regulation by the endocannabinoid N-Arachidonoyl dopamine (NADA)**. 2017. 228 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of California San Francisco, California, 2017. Disponível em: <<https://escholarship.org/uc/item/7wj3d52v>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

LEVINE, R. L.; HOOGENRAD, N. J.; KRETCHMER, N. A review: Biological and clinical aspects of pyrimidine metabolism. **Pediatric Research**, Stanford, v. 8, n. 7, 1974.

LEVONEN, A.-L.; DICKINSON, D. A.; MOELLERING, D. R.; MULKAHY, R. T.; FORMAN, H. J.; DARLEY-USMAR, V. M. Biphasic effects of 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. **Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology**, Birmingham, v. 21, n. 11, p. 1846-1851, 2001.

LIARZI, O.; BAR, E.; LEWINSOHN, E.; EZRA, D. Use of endophytic fungus *Daldinia cf. concentrica* and its volatiles as bio-control agents. **PLoS ONE**, Rishon LeZion, v. 11, n. 12, p. e0168242, 2016.



LIPID WEB. Disponível em: < <https://www.lipidhome.co.uk/>>. Acesso em: 10 mai. 2020.

LU, H. -L.; ST. LEGER, R. J. Insect immunity to entomopathogenic fungi. **Advances in Genetics**, Maryland, v. 94, p. 251-285, Academic Press, 2016.

MEENA, M.; PRASAD, V.; ZEHRA, A.; GUPTA, V. K.; UPADHYAY, R. S. Mannitol metabolism during pathogenic fungal-host interactions under stressed conditions. **Frontiers in Microbiology**, Varanasi, v. 6, 2015.

MISHRA, A.; MALIK, A. Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. **Bioresource Technology**, New Delhi, v. 171, p. 217-226, 2016.

MURPHY, B. R.; DOOHAN, F. M.; HODKINSON, T. R. Matching source and sink: An environmentally tailored fungal endophyte consortium increases yield in three field-grown barley cultivars. **Cogent Food & Agriculture**, Dublin, v. 4, ID. 1484599, 2018.

MYLLYMÄKI, H.; RÄMET, M. JAK/STAT pathway in Drosophila immunity. **Scandinavian Journal of Immunology**, Tampere, v. 79, n. 6, p. 377-385, 2014.

NICOLAESCU, O.; VARUT, R.-M.; PATRUNA, S. Determination of the polyphenolic content of *Dorycnium herbaceum* plant extract and testing *in vivo* antioxidant effect, comparative with Bilberry. **Revista de Chimie**, Craiova, v. 70, n. 2, p. 667-670, 2019.

NOVERR, M. C.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. **Infection and Immunity**, Michigan, v. 70, n. 1, p. 400-402, 2002.

OLOMBRADA, M.; MEDINA, P.; BUDIA, F.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, Á.; GARCÍA-ORTEGA, L. Characterization of a new toxin from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: the ribotoxin anisoplin. **Biological Chemistry**, Madrid, v. 398, n. 1, p. 135-142, 2017.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus insect cuticle. **Insects**, Gainesville, v. 4, n. 3, p. 357-374, 2013.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Molecular genetics of *Beauveria bassiana* infection of insects. **Advances in Genetics**, Gainesville, v. 94, p. 165-249, 2016.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi. **Current Genetics**, Gainesville, v. 61, n. 3, p. 239-249, 2015.

PELL, J.K; HANNAM, J.J; STEINKRAUS, J.J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, Herdforshire, v. 55, p.187–198, 2010

PELUSO, G.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BRESCIANO, E.; VUOTTO, M. L. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. **Journal of Natural Products**, Napoli, v. 50, n. 5, p. 639-646, 1995.

PERFECT, J. R.; TOFFALETTI, D. L.; RUDE, T. H. The gene encoding Phosphoribosylaminoimidazole Carboxylase (*ADE2*) Is Essential for Growth of *Cryptococcus neoformans* in Cerebrospinal Fluid. **Infection and Immunity**, Durham, v. 61, n. 10, p. 4446-4451, 1993.

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, Shangai, v. 83, p. 96-103, 2018.

QUESADA-MORAGA, E.; CARRASCO-DÍAZ, J. A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, Cordoba, v. 130, n. 8, p. 442-452, 2006

REDDY, C. A.; SARAVANAN, R. S. Polymicrobial multi-functional approach for enhancement of crop productivity. **Advances in Applied Microbiology**, Michigan, v. 82, p. 53-113, Academic Press, 2013.

RHOME, R.; POETA, M. DEL. Lipid signaling in pathogenic fungi. **Annual Review of Microbiology**, South Carolina, v. 63, p. 119-131, 2009.

RODRIGUEZ-SUAREZ, R.; XU, D.; VEILLETTE, K.; DAVISON, J.; SILLAOTS, S.; KAUFFMAN, S.; HU, W.; BOWMAN, J.; MARTEL, N.; TROSOK, S.; WANG, H.; ZHANG, L.; HUANG, L.-Y.; LI, Y.; RAHKHOODAE, F.; RANSOM, T.; GAUVIN, D.; DOUGLAS, C.; YOUNGMAN, P.; BECKER, J.; JIANG, B.; ROEMER, T. Mechanism-of-Action Determination of GMP Synthase Inhibitors and Target Validation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Chemistry and Biology**, Quebec, v. 14, n. 10, p. 1163-1175, 2007

ROTARU, L. T.; VARUT, R. M.; COVEI, M. B.; COSTACHE, I. I.; NOVAC, M.; NICOLAESCU, O.; FLORESCU, C.; PETRICA, A.; KOSTICI, R.; CIOBANU, D. Determination of antioxidant components and activity of *Tamarix ramosissima* comparative with *Vaccinium myrtillus* on Streptozotocin-diabetic mice. **Revista de Chimie**, Craiova, v. 69, n. 7, p. 1860-1865, 2018.

RUDGE, S. A.; SCIORRA, V. A.; IWAMOTO, M.; ZHOU, C.; STRAHL, T.; MORRIS, A. J.; THORNER, J.; ENGBRECHT, J. Roles of Phosphoinositides and Spo14p (phospholipase D)-generated Phosphatidic acid during yeast sporulation. **Molecular Biology of the Cell**, San Diego, v. 15, p. 207-218, 2004.

RUTHERFORD, C.; SPEIRS, C.; WILLIAMS, J. J. L.; EWART, M.-A.; MANCINI, S. J.; HAWLY, S. A.; DELLES, C.; VIOLLET, B.; COSTA-PEREIRA, A. P.; BAILLIE, J. S.; SALT, I. P.; PALMER, T. M. Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signaling. **Science Signaling**, Glasgow, v. 9, v. 453, ra109, 2016.

SAG, D.; CARLING, D.; STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype. **The Journal of Immunology**, Louisville, v. 181, n. 12, p. 8633-8641, 2008.

SANJAY, K. R. Characterization of *Aspergillus carbonarius* mutant in relation to xanthin production, toxicity studies and fermentation conditions for pigment production. 2009. 179 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of Mysore, India, 2009. Disponível em: < <http://ir.cftri.com/9954/1/Sanjay.pdf> >. Acesso em: 27. Jan. 2021.

SANTHANAM, R.; LUU, T. V.; WEINHOLD, A.; GOLDBERG, J.; OH, Y.; BALDWIN, I. T. Native root-associated bacteria rescue a plant from sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. **Proceedings of National Academy of Sciences PLUS**, Jena, v. 112, n. 36, p. 5013-5020, 2015.

SANTHANAM, R.; MENEZES, R. C.; GRABE, V.; LI, D.; BALDWIN, I. T.; GROTEN, K. A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. **Molecular Ecology**, Jena, v. 28, n. 5, p. 1154-1169, 2019.

SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. 15d-PGJ2: The anti-inflammatory prostaglandin? **Clinical Immunology**, New York, v. 114, p. 100-109, 2005.

SHARMA, C. K.; VISHNOI, V. K.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mug bean. **Rhizosphere**, Haridwar, v. 5, p. 71-75, 2018.

SILVERMAN, N.; MANIATIS, T. NF- $\kappa$ B signaling pathway in mammalian and insect innate immunity. **Genes and Development**, Massachusetts, v. 15, p. 2321-2342, 2001.

SOLOMON, P. S.; WATERS, O. D. C.; JÖRGENS, C. I.; LOWE, R. G. T.; RECHBERGEN, J.; TRENGOVE, R. D.; OLIVER, R. P. Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch). **Biochemical Journal**, Perth, v. 399, n. 2, p. 231-239, 2006.

STRAUS, D. S.; PASCUAL, G.; LI, M.; WELCH, J. S.; RICOTE, M.; HSIANG, C. -H.; SENGCHANTHALANGSY, L. L.; GHOSH, G.; GLASS, C. K. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> inhibits multiple steps in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, Riverside, v. 97, n. 9, p. 4844-4849, 2000.

STUART, A. K. C.; FURUIE, J. L.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Increased mortality of the European Pepper Moth *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera Crambidae) using entomopathogenic fungal consortia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Curitiba, v. 177, ID. 107503, 2020.

SUN, M. H.; LIU, X. Z. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic hyphomycetes as fungal biocontrol agents. **Mycopathologia**, Beijing, v. 161, n. 5, p. 295-305, 2006.

SUN, H.-H.; MAO, W.-J.; CHEN, Y.; GUO, S.-D.; LI, H.-Y.; QI, X.-H.; CHEN, Y.-L. XU, J. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23.2. **Carbohydrate Polymers**, Shandong, v. 78, n. 1, p. 117-124, 2009.

TAHIR, J.; DIJKWEL, P.  $\beta$ -Substituting alanine synthases: role in cysteine metabolism and abiotic and biotic stress signaling in plants. **Functional Plant Biology**, Palmerston North, v. 43, n. 4, p. 307-323, 2016.

TILLMANN, A. T.; STRIJBIS, K.; CAMERON, G.; RADMANESHFAR, E.; THIEL, M.; MUNRO, C. A.; MACCALLUM, D. M.; DISTEL, B.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P. Contribution of Fdh3 and Glr1 to Glutathione redox state, stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. **PLoS ONE**, Aberdeen, v. 10, n. 6, e0126940, 2015.

TSITSIGIANNIS, D. I.; KELLER, N. P. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. **TRENDS in Microbiology**, Norwich, v. 15, n. 3, p. 109-118, 2007.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2006.

VILAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise de metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 9, n. 36, p. 58-69, 2006.

VYLKOWA, S.; LORENZ, M. C. Phagosomal neutralization by the fungal Pathogen *Candida albicans* Induces Macrophage Pyroptosis. **Infection and Immunity**, Houston, v. 85, n. 2, e00832-16, 2017.

WU, Q.; SUN, R.; NI, M.; YU, J.; LI, Y.; YU, C.; DOU, K.; REN, J.; CHEN, J. Identification of a novel fungus *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. **PloS ONE**, Shanghai, v. 12, n. 6, ID. e0179957, 2017.

XIAO, G.; YING, S.-H.; ZHENG, P.; WANG, Z.-L.; ZHANG, S.; XIE, X.-Q.; SHANG, Y.; ST. LEGER, R. J.; ZHAO, G.-P.; WANG, C.; FENG, M. C. Genomic perspectives evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific reports**, Shanghai, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2012.

YANG, L.; RU, Y.; CAI, X.; YIN, Z.; LIU, X.; XIAO, Y.; ZHANG, H.; ZHENG, X.; WANG, P.; ZHANG, Z. Molmd4 mediates crosstalk between moPdeH-cAMP signalling and purine metabolism to govern growth and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, Nanjing, v. 20, n. 4, p. 500-518, 2019.

YUN, S. J.; KIM, H.; JUNG, S.-H.; KIM, J. H.; RYU, J. E.; SINGH, N. J.; JEON, J.; HAN, J.-K.; KIM, C.-H.; KIM S.; JANG, S. K.; KIM, W. J. The mechanistic insights of a specific interaction between 15d-Prostaglandin-J2 and eIF4A suggests an evolutionary conserved role across species. **Biology Open**, Pohang, v. 7, n. 11, 2018.

ZHANG, L.-B.; TANG, L.; YING, S.-H.; FENG, M.-G. Relative roles of glutathione reductase and four glutaredoxins in glutathione redox, antioxidant activity, and iron

homeostasis on *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Hangzhou, v. 100, n. 13, p. 5907-5917, 2016.

ZHANG, L.-B.; QIU, T.-T.; GUAN, Y.; HUANG, Z.-H.; YE, X.-Y. Analyses of transcriptomic and metabolomics reveal pathway of vacuolar Sur7 contributed to biocontrol potential of entomopathogenic *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Fuzhou, p. 107564, 2021.

ZHANG, X.-U.; LI, Q.-H.; XU, Z.-D.; DOU, J.-J. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medicine science: a systematic review. **RSC Advances**, v. 10, p. 3092-3104, 2020.

ZHU, Y. P.; BROWN, J. R.; SAG, D.; ZHANG, L.; SUTTLES, J. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Regulates IL-10-Mediated Anti-Inflammatory Signaling Pathways in Macrophages. **The Journal of Immunology**, Louisville, v. 194, n. 2, p. 584-594, 2015.

ZIPPER, L.; JASSMANN, D.; BURGMEYER, S.; GÖRLICH, B.; REIFF, T. Ecdysone steroid hormone remote controls intestinal stem cell fate decision via the PPAR $\gamma$ -homolog *Eip75B* in *Drosophila*. **Elife**, Düsseldorf, v. 9, p. e55795, 2020.

## APÊNDICE 1 – LISTA DE METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR GC-MS

Metabólito	ID Nist
1-Deoxypentitol	38399-mainlib
1-Monopalmitin	37037-mainlib
1,2-Hexadecanediol	197559-mainlib
1,2,3,4-tetrahydro-6-methoxy-1-salicyl-7-Isoquinolinol	146641-mainlib
1,3-Butanediol	9344-replib
1,4-lactone, Allonic acid	38863-mainlib
1,5-Anhydro-D-sorbitol	38852-mainlib
2'-Deoxyadenosine	39426-mainlib
2-Deoxy-erythro-pentonic acid	38732-mainlib
2-deoxy-D-Erythro-Pentopyranose	38368-mainlib
2-Hydroxyglutaric acid	38518-mainlib
2-oxo-Propanoic acid	119415-mainlib
2-Phosphoglyceric acid	182213-mainlib
2-pyrrolidinone	20964-replib
2,5-Dimethoxymandelic acid	180081-mainlib
3-Deoxyhexitol	39620-mainlib
4-Aminobutanoic acid	143908-mainlib
4-Hydroxybutanoic acid	119436-mainlib
5-Hydroxypipercolic acid	182275-mainlib
5-Methyluridine	39480-mainlib
6-Fluoro-alpha-methyltryptamine	86261-mainlib
Acetic acid	119424-mainlib
alpha-D-(+)-Talopyranose	39379-mainlib
Adenosine	39649-mainlib
Adenosine-5'-monophosphate	39093-mainlib
Adrenaline	86262-mainlib
Ala-beta-Ala	86255-mainlib
Alanine	86265-mainlib
Alanylglycine	86256-mainlib
alpha-D-Mannopyranose	164557-mainlib
Aminomalonic acid	38864-mainlib
Ammelide	204743-mainlib
Asparagine	9095-replib
Aucubin	37875-mainlib
b-Aminoisobutyric acid	39144-mainlib
Butanedioic acid	119441-mainlib
cis-4-Decene-1,10-dioic acid	37794-mainlib
Citric acid	191513-mainlib
Cystathionine	171347-mainlib
Cysteine	172585-mainlib
D-(-)-Fructofuranose	39494-mainlib
D-(+)-Talofuranose	170819-mainlib
Deoxyglucose	39363-mainlib

Metabolito	ID Nist
Deoxyguanosine	39860-mainlib
D-Galactofuranose phosphate	39967-mainlib
D-Galactose	9365-replib
D-Glucitol phosphate	40053-mainlib
Diisooctyl phthalate	21799-replib
D-Mannopyranose phosphate	39404-mainlib
D-Sorbitol	38923-mainlib
D-Xylose	39397-mainlib
D-Xylopyranose	39394-mainlib
Ethanimidic acid	119576-mainlib
Ethyl .alpha.-D-glucopyranoside	164509-mainlib
Fumaric acid	182607-mainlib
Galactaric acid	9634-replib
Gluconic acid phosphate	39947-mainlib
Gluconic acid	39362-mainlib
Glucopyranose	39377-mainlib
Glyceric acid	38809-mainlib
Glycerol	39414-mainlib
Glycerol monostearate	86865-mainlib
Glycerol-3-phosphate	40201-mainlib
Glyceryl-glycoside	164510-mainlib
Glycine	24429-replib
Guanosine	40113-mainlib
Gulonic acid	40134-mainlib
Heptadecanoic acid	38392-mainlib
Inosine	39534-mainlib
L-(-)-Arabitol	38768-mainlib
Lactic acid	38429-mainlib
L-Aspartic acid	39626-mainlib
L-Cystine	171348-mainlib
Leu-Gly	130516-mainlib
L-Fucitol	38428-mainlib
L-fucose	39381-mainlib
L-Glutamic acid	182910-mainlib
L-Glutamine	39000-mainlib
L-Histidine	127203-mainlib
L-Homocystine, [S-(R*,R*)]-	9264-replib
L-Homoserine	171358-mainlib
Linoleic acid	9961-replib
L-Isoleucine	130529-mainlib
L-Leucine	130526-mainlib
L-Lysine	39149-mainlib
L-Methionine	145224-mainlib
L-Norleucine	39020-mainlib
L-Norvaline	116925-mainlib



Metabólito	ID Nist
L-Proline	9291-replib
L-threonine	38447-mainlib
L-Tryptophan	163567-mainlib
L-Valyl-L-leucine	116931-mainlib
Lyxose	39380-mainlib
Malic acid	38880-mainlib
Mannitol	38929-mainlib
meso-Erythritol	38855-mainlib
Methyl galactoside	39358-mainlib
Methyl phosphate	180906-mainlib
Methylmaleic acid	21394-replib
Monostearin	209278-mainlib
Myoinositol 1-phosphate	38857-mainlib
Myo-Inositol	9617-replib
N-Acetyl-D-glucosamine	142585-mainlib
N-alpha-Acetyl-L-Lysine	143916-mainlib
N-ethoxycarbonyl-, nonyl ester, L-Norvaline	117448-mainlib
N-Methyl-L-prolinol	48768-mainlib
N-methyl-N-methoxycarbonyl-, undecyl ester, Alanine	86442-mainlib
N-methoxycarbonyl-, isohexyl ester, L-Norleucine	117068-mainlib
Oleamide	6997-replib
Octahydro-2,2'-Bifuran	35135-mainlib
Ornithine	115343-mainlib
Phenylalanine	39552-mainlib
Palmitic Acid	86863-mainlib
Phenylpropanolamine	86253-mainlib
Pipecolic acid	129208-mainlib
Pseudo uridine	39533-mainlib
Putrescine	143937-mainlib
Pyroglutamic acid	49101-mainlib
Ribitol	9203-replib
Ribonic acid	38766-mainlib
Serine	164581-mainlib
Thymidine	68930-mainlib
Thymine	185875-mainlib
Traumatic acid	37655-mainlib
Tyramine	24434-replib
Tyrosine	147068-mainlib
Uracil	38117-mainlib
Uridine	39489-mainlib
Uridine-5'-monophosphate	39096-mainlib
Valine	36240-mainlib
Val-Val	116932-mainlib
Xanthin	40186-mainlib

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: Mainlib: *main EI MS Database*; Replib: *replicate spectra Database*

## 5.2 ARTIGO IV - METABOLÔMICA DA INTERAÇÃO ENTRE UM CONSÓRCIO FÚNGICO E *Duponchelia fovealis*: MECANISMOS DE ATAQUE E SOBREVIVÊNCIA.

### RESUMO

Atualmente uma das mais preocupantes pragas que atacam o morangueiro no Brasil é a mariposa *Duponchelia fovealis*, principalmente por ser uma praga exótica e por não possuir métodos de controle registrados até então. Recentemente nosso grupo observou aumento na mortalidade de *D. fovealis* inoculada com um consórcio fúngico formado por duas linhagens de *Beauveria bassiana*, frente aos fungos aplicados isoladamente. Entretanto nada se sabe sobre a interação molecular entre consórcio fúngico e lagarta, levantando diversos questionamentos relacionados ao maior controle observado. Além disso, insetos possuem uma biologia adaptável, por isso a seleção de resistência por parte de produtos químicos e biológicos aplicados constantemente na agricultura, tornou-se um fenômeno comumente observado. Desta forma, neste trabalho, buscamos de forma pioneira avaliar a interação molecular entre consórcio fúngico e lagartas visando um melhor entendimento do processo ocorrido no biocontrole bem como no sistema de defesa da lagarta frente ao ataque do consórcio. Para isso lagartas de *D. fovealis* foram inoculadas com um consórcio de *B. bassiana* e após sete dias, as lagartas mortas e lagartas sobreviventes foram avaliadas através de GC-MS e LC-MS. Através do GC-MS foram detectadas 137 moléculas nas lagartas mortas e 141 nas lagartas sobreviventes. Por LC-MS foi possível detectar nas lagartas mortas 137 moléculas no modo negativo e 174 no modo positivo e nas lagartas sobreviventes 148 no modo negativo e 111 no positivo. Foram identificados, nas lagartas mortas, diferentes metabólitos que podem estar envolvidos no aumento da mortalidade provocada pelo consórcio, as quais possuem principalmente ação antioxidante, que irão suprimir o sistema imune da lagarta, e outras com potencial inseticida como Diltiazem, Tansolusina e Ácido 2,5-Dimetoximandelico. Nas lagartas sobreviventes, os principais mecanismos possivelmente envolvidos no processo de resistência são o estímulo à resposta inflamatória, induzido por 2-Palmitoilglicerol e a ação antifúngica do metabólito Aegle Marmelos Alcaloide-C. Além disso, foram detectados metabólitos que podem estar envolvidos no processo de mortalidade tardia, demonstrando que as lagartas que sobreviveram aos sete dias de ensaio, podem estar em processo de morte.

Palavras-chave: Metabolômica. GC-MS. LC-MS/MS. *Beauveria bassiana*. *European Pepper Moth*.

METABOLOMICS OF THE INTERACTION BETWEEN A FUNGAL CONSORTIUM  
AND *Duponchelia fovealis*: ATTACK AND SURVIVAL MECHANISMS.

**ABSTRACT**

Currently, one of the most worrying pests that attack strawberries in Brazil is the moth *Duponchelia fovealis*, mainly because it is an exotic pest and there are no registered methods to control it. Recently, our group observed an increase in the mortality of *D. fovealis* inoculated with a fungal consortium formed by two strains of *Beauveria bassiana*, compared to the fungi applied alone. However, nothing is known about the molecular interaction between fungal consortium and this caterpillar, raising several questions related to the increased mortality observed. Furthermore, insects have an adaptable biology, so the selection of resistance by chemical and biological products constantly applied in agriculture has become a commonly observed phenomenon. Thus, in this work, we sought to pioneer the evaluation of the molecular interaction between fungal consortium and *D. fovealis* aiming at a better understanding of the process that occurred in biocontrol as well as in the defense system of the caterpillar against the consortium attack. For this purpose, caterpillars were inoculated with a consortium of two *B. bassiana* strains and after seven days, the dead and surviving caterpillars were evaluated using GC-MS and LC-MS/MS. One hundred and thirty-seven molecules were detected by GC-MS in dead caterpillars and 141 in surviving ones. By LC-MS/MS it was possible to detect in dead caterpillars 137 and 174 molecules in negative and positive mode, respectively, and in the surviving ones 148 and 111 in negative and positive mode, respectively. Different metabolites were identified that may be involved in the increase in mortality caused by the consortium, which mainly have antioxidant action, that will help in the evasion of the caterpillar's immune system. Some of the other metabolites identified have insecticidal potential such as Diltiazem, Tamsulosin and 2,5-Dimethoxymandelic acid. In surviving caterpillars, the main mechanisms possibly involved in the resistance process are the pro-inflammatory response, induced by 2-Palmitoylglycerol and the antifungal action of the metabolite Aegle Marmelos Alkaloid-C. In addition, metabolites that may be involved in the late mortality process were detected, demonstrating that caterpillars that survived longer than 7 days may be in death process.

Keywords: Metabolomics. GC-MS. LC-MS/MS. *Beauveria bassiana*. European Pepper Moth.

## 1 INTRODUÇÃO

O controle biológico de insetos é uma importante estratégia do manejo integrado de pragas (MIP), que apresenta alto potencial de controle com reduzido impacto ao meio ambiente e a saúde do produtor e do consumidor (RUSCH, BOMMARCO e EKBOM, 2017). Esta estratégia de controle é amplamente utilizada quando pragas exóticas são introduzidas em novas áreas e atingem alta densidade populacional, quando a introdução de agentes de biocontrole pode então regular o desenvolvimento da praga emergente (HAJEK e DELALIBERA JR, 2010). Dentre as classes de agentes de controle biológico utilizados no controle de pragas, destacam-se os fungos entomopatogênicos. Eles causam infecções nos insetos penetrando em sua cavidade corporal, desenvolvendo-se e causando sua morte (PELL, HANNAM e STEIKRAUS 2010). Estudos recentes têm demonstrado importante avanço no controle biológico de pragas, apresentando aumento no potencial patogênico quando da associação de diferentes microrganismos, atuando como consórcio microbiano. A utilização desses consórcios vem apresentando, o controle de doenças e pragas de diversas culturas, aumento da produtividade, tolerância a situações extremas de temperatura e humidade, descontaminação de solos, indução de resistência sistêmica (SANTHANAM et al., 2015; SHARMA et al., 2018; SANTHANAM et al., 2019, STUART et al., 2020).

Em seu habitat os insetos estão em constante contato com diversas moléculas químicas produzidas por diferentes organismos e vão desde partículas não tóxicas, como os feromônios, a moléculas altamente tóxicas, como pesticidas e alguns aleloquímicos. Devido a isso, eles possuem um mecanismo de resistência plástico e complexo, adaptando-se as toxinas do ambiente e das plantas que consomem, além disso, a pressão de seleção exercida por competidores ou predadores também influenciam no desenvolvimento de alguns traços de resistência (DESPRÉS, DAVID e GALLET, 2007).

Inseticidas químicos selecionam indivíduos resistentes, desta forma, durante muitos anos, os mecanismos de resistência estudados, foram aqueles relacionados a essa classe de produtos. Entretanto, com o passar dos anos e com o relevante aumento de produtos biológicos para controle de pragas agrícolas, alguns estudos passaram a evidenciar o aparecimento de resistência à produtos biológicos, como aqueles a base de *Bacillus thuringiensis* e *Beauveria bassiana*, por exemplo (FERRÉ

e VAN RIE, 2002; DUBOVSKYI et al., 2013). Decifrar os mecanismos moleculares de resistência aos métodos de controle empregados então, passou a representar uma área de estudo promissora, visando o desenvolvimento de metodologias de manejo de insetos duradouras e eficazes (DESPRÉS, DAVID e GALLET, 2007).

A lagarta da coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) é uma das mais importantes pragas do morangueiro atualmente no Brasil e por ser uma praga exótica e relativamente recente no país, ainda não existe nenhum produto, químico ou biológico, registrado para seu controle (ZAWADNEAK et al., 2016; AGROFIT, 2021). Por este e outros motivos, alguns grupos de pesquisa tem dedicado esforços para encontrar um método de controle que seja sustentável, não cause danos ao meio ambiente, como o controle biológico, e ainda seja efetivo no controle desta praga em morangueiros no Brasil. Poitevin e colaboradores (2018) descreveram várias linhagens do fungo entomopatogênico *B. bassiana* capazes de controlar esta praga e posteriormente, nosso grupo observou um aumento no controle de *D. fovealis*, provocado pela associação de duas linhagens de *B. bassiana*, atuando como um consórcio fúngico (STUART et al., 2020). Entretanto, apesar do alto potencial de controle destes fungos, algumas lagartas foram capazes de sobreviver mesmo após a inoculação das linhagens mais patogênicas, levantando a hipótese de resistência/defesa a infecção fúngica.

Estudos moleculares que abordem a interação entre insetos e seus patógenos são de extrema importância, pois trazem uma perspectiva dos mecanismos envolvidos na patogenicidade do agente controlador e na susceptibilidade ou resistência do inseto (FRAGA-CORRAL et al., 2020; ZHANG et al., 2020). A metabolômica é uma excelente alternativa para avaliar o impacto de diferentes variáveis ambientais causados à determinados organismos, de modo que se possa fazer uma correlação direta da condição metabólica destes organismos com a sua condição fenotípica.

Desta forma, neste trabalho, buscamos avaliar por metabolômica não direcionada, acessada através das cromatografias gasosa (GC) e líquida (LC) acopladas à espectrômetros de massas (MS), os metabólitos envolvidos na interação entre um consórcio formado por duas linhagens diferentes de *B. bassiana* e seu inseto alvo *D. fovealis*, afim de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no controle e morte de *D. fovealis* causado pelo consorcio, bem como estabelecer uma relação que justifique a sobrevivência de algumas lagartas e uma possível indução de resistência.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 2.2.1 Criação de *Duponchelia fovealis*

As lagartas foram obtidas na criação mantida no Laboratório de entomologia Prof. Ângelo Moreira da Costa Lima, do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, as quais foram alimentadas por dieta artificial desenvolvida especificamente para *D. fovealis* (FIGURA 1). Esta dieta consiste de: 65 g/L de sementes de feijão cultivar carioca, 50 g/L de gérmen de trigo, 25 g/L de soja texturizada, 25 g/L de caseína, 31 g/L de levedura de cerveja, 20 g/L de ágar bacteriológico, 3 g/L de ácido ascórbico, 1,5 g/L de ácido sórbico, 2,5 g/L de nipagin metilparabeno, 0,14 g/L de tetraciclina, 3 mL de formaldeído 30%, 8 mL de vitamina Vanderzant, 50 mL de suco vegetal V8® (GONÇALVES et al., 2012; ZAWADNEAK et al., 2017). A criação foi mantida em ambiente com controle de temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $60\% \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14 horas. Para montagem dos bioensaios foram utilizadas lagartas de terceiro instar.

FIGURA 1 – CRIAÇÃO DE *Duponchelia fovealis*.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: A) Lagartas de terceiro Instar em dieta artificial.  
B) Mariposas macho e fêmea criadas em pote plástico próprio.  
C) Pupas em placa de petri.

## 2.2 FORMAÇÃO DO CONSÓRCIO FÚNGICO

O consórcio foi elaborado de acordo com Stuart et al. (2020). Culturas monospóricas de duas linhagens de *Beauveria bassiana* (Bov 2 e Bov 3) foram cultivados separadamente em placa de Petri contendo meio de cultura Ágar Sabouraud (SBR), em incubadora BOD por 14 dias a 28 °C no escuro. Passado esse período foram preparadas soluções de conídios de cada linhagem conforme segue: o micélio e os conídios foram raspados do meio de cultura com auxílio de uma espátula de metal estéril e transferidos para um tubo contendo solução salina a 0,85% (NaCl contendo 0.01% de Tween 80®). Esta suspensão foi homogeneizada e filtrada em gaze estéril, os conídios foram contados em câmara de Neubauer e então diluídos para a concentração de uso ( $1 \times 10^8$  conídios. mL<sup>-1</sup>). Em seguida, 30 µL da suspensão de conídios de cada linhagem foram inoculados em uma nova placa de Petri contendo ágar SBR e incubados nas mesmas condições anteriormente descritas.

Para utilização no bioensaio, a suspensão de conídios do consórcio e dos fungos separadamente foram preparadas e diluídas em solução salina, de modo a obter uma concentração final de  $2 \times 10^7$  conídios. mL<sup>-1</sup> (STUART et al., 2020).

## 2.3 BIOENSAIO DE CONTATO DIRETO

O bioensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por SILVA et al. (2003) com algumas modificações. Para isso grupos de 10 lagartas de terceiro instar foram transferidas, com auxílio de um pincel de cerdas finas, para folhas de morangueiro e pulverizadas com 1 mL de suspensão de conídios na concentração de  $2 \times 10^7$  conídios/mL, acrescida do espalhante adesivo Tween 80®. Esta concentração de conídios foi utilizada para cada uma das linhagens, bem como para os consórcios, sendo o tratamento controle constituído por solução salina 0,85% e Tween 80®. As pulverizações foram realizadas com um microatomizador “Airbrush” elétrico, modelo “VL”, acoplado a um compressor regulado a 10 PSI. Após a pulverização, as folhas contendo as lagartas foram mantidas por sete dias em condições controladas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14h.

As avaliações de mortalidade foram realizadas no sétimo dia e foram consideradas mortas as lagartas que não responderem ao estímulo proporcionado

pelo toque de um pincel de cerdas finas. Estas foram acondicionadas em freezer - 80°C para posterior extração de metabólitos e análise metabólica.

Os tratamentos utilizados foram: lagartas controle, lagartas inoculadas com Bov 3, lagartas inoculadas com Bov 2 e lagartas inoculadas com o consórcio (TABELA 1).

TABELA 1. DESCRIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRATAMENTO AVALIADAS NO PRESENTE TRABALHO.

	ID	Descrição
Grupo 1	LagM_Cons	Mortas pelo consórcio
	LagM_Bov2	Mortas pela linhagem fúngica Bov 2
	LagM_Bov3	Mortas pela linhagem fúngica Bov 3
Grupo 2	LagS	Controle negativo
	LagS_Cons	Sobreviventes a inoculação do consórcio
	LagS_Bov2	Sobreviventes a inoculação de Bov 2
	LagS_Bov3	Sobreviventes a inoculação de Bov 3

FONTE: A autora (2021)

## 2.4 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS

A extração de metabólitos foi realizada de acordo com Bligh e Dyer (1959), com pequenas modificações. Após o bioensaio de contato direto, as lagartas foram organizadas de acordo com cada tratamento, em seguida foram trituradas com nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>). A extração foi realizada a partir de 200 mg do triturado que foi adicionado em um microtubo de 1 mL (Eppendorf, Germany) previamente tratado com metanol. Ao triturado, foi adicionado 125 µL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), 50 µL de água ultra-pura (H<sub>2</sub>O) e 250 µL de metanol gelado (MeOH). Os microtubos foram vigorosamente agitados em vórtex e levados ao banho ultrassônico (Odontobrás, Riberirão-SP) a 20 Hz. s<sup>-1</sup> por 10 minutos, mantido à temperatura aproximada de 4 °C. Em seguida foram adicionados 50 µL de CHCl<sub>3</sub> e 50 µL de H<sub>2</sub>O e agitados em vórtex novamente. Por fim as amostras foram centrifugadas (Eppendorf, Germany) por 5 minutos a 14000 rpm e 4 °C, o sobrenadante foi filtrado em filtro Whatman® 0,22 µm (Merck, Germany) e transferido para um *vial* de vidro. O *vial* foi levado ao liofilizador (Thermo Fischer Scientific, MA) até total secagem das amostras. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 200 µL de solução extratora e aliqüotadas (100 µL/alíquota) para utilização no GC-MS e no LC-MS/MS.



## 2.5 ANÁLISE DE METABOLÔMICA NÃO DIRECIONADA

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética de Plantas Max Feffer da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), após a extração de metabólitos, para a qual foram utilizados métodos específicos para cada tipo de amostra biológica (fungos ou lagartas), descritos com detalhes nos capítulos a seguir.

Foram analisadas três réplicas técnicas de cada uma das réplicas biológicas, totalizando 15 conjuntos de dados para cada tratamento (TABELA 1), além disso, como controle de qualidade (CQ), foram criados *pools* de metabólitos para cada grupo, os quais foram injetados previamente às amostras do grupo, visando condicionar e equilibrar o sistema.

### 3.5.1 Identificação de metabólitos por GC-MS

Após a extração de metabólitos os extratos foram aliqüotados para a realização das análises de GC-MS e LC-MS/MS. À aliqüota do extrato destinada ao GC-MS, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  dos compostos isotopicamente marcados: ácido succínico (D4, 98% - DLM 584-5), ácido mirístico (1, 2, 3 – 13C3, 99% - CLM 3665-0.5) e ácido palmítico (1, 2, 3, 4 – 13C4), preparados na concentração de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  que foram utilizados como padrões externos. Em seguida a amostra foi novamente liofilizada para a conseguinte realização da derivatização, utilizando-se 30  $\mu\text{L}$  de metoxiamina (15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em piridina, por 16 h em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a siliilação, adicionando às amostras 30  $\mu\text{L}$  de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1 % de TMCS (trimetilclorosilano) e mantendo em temperatura ambiente por 1 h. Por fim, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de heptano contendo 15 ng/g de metil esterase. Posteriormente, as amostras foram analisadas de acordo com Budzinski et al., (2016b), com pequenas modificações, através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Nessa etapa, foram utilizados uma série de n-alcanos ( $\text{C}_{12}$  –  $\text{C}_{40}$ ), o que permite calcular o índice de retenção das amostras (JONSSON et al., 2005). Um microlitro de cada uma das amostras derivatizadas foi injetado automaticamente em modo *splitless* pelo amostrador automático CTC Combi Pal Xt Duo (CTC Analytics AG, Suíça) no cromatógrafo gasoso Agilent 7890A equipado com duas colunas capilares de sílica fundida, uma com 20 m

x 0.18 mm x 0.18  $\mu\text{m}$  do filme DB-5 (Agilent) como fase estacionária e a segunda com 0.9 m x 0.10 mm x 0.10  $\mu\text{m}$  do filme RX-T 17 (Restek) como fase estacionária. A temperatura de injeção foi de 280  $^{\circ}\text{C}$ , com fluxo de purga de 20  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O fluxo de gás através da coluna foi de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , a temperatura da coluna foi mantida a 70  $^{\circ}\text{C}$  por 2 min e em seguida aumentando em 15  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até atingir 320  $^{\circ}\text{C}$ , onde foi mantida por 4 min. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons do GC x GC/TOF-MS Pegasus 4D (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA), sob temperatura de 250  $^{\circ}\text{C}$ . O feixe de elétrons foi gerado a 70 eV com uma corrente de ionização de 20 mA e 20 espectros $\cdot\text{s}^{-1}$ , registrados na faixa de 45-800  $m/z$ . A voltagem do detector foi de 1500 V.

O processamento dos dados de GC-MS foi no programa ChromaTOF, versão 4.32, no qual foi realizada correção da linha de base, deconvolução, obtenção do índice de retenção (RI), correção do tempo de retenção (RT), identificação e alinhamento de picos e identificação dos metabólitos com o auxílio da biblioteca da NIST, versão 11. Foram considerados metabólitos válidos apenas aqueles com score igual ou maior a 700. A intensidade de cada metabólito foi normalizada pela contagem iônica total (TIC) de cada amostra.

As análises estatísticas foram realizadas no *software online MetaboAnalyst* 4.0 (CHONG, WISHART e XIA, 2019, disponível em <http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>). Os dados foram transformados por  $\log^2$  e escalonados por Pareto, que utiliza a raiz quadrada do desvio padrão para escalonar cada variável encontrada (VAN DEN BERG et al., 2006). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) com  $p \leq 0.05$  ajustado por *False Discovery Rate* (FDR); análise de correlação, usada para visualizar a correlação entre as diferentes amostras, análise de componente principal (PCA), análise multivariada e não supervisionada que avalia a inter-relação entre um conjunto de dados e explica essas variáveis em seus componentes.

### 3.5.2 Identificação de metabólitos por LC-MS/MS

Imediatamente antes da corrida de LC-MS, as amostras foram eluídas em 200  $\mu\text{L}$  da solução extratora e vigorosamente agitadas até total dissolução dos metabólitos. A quercetina ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ ) foi usada como padrão externo. Os perfis metabólicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a

um espectrômetro de massas (UPLC-MS). As amostras foram inicialmente injetadas em um cromatógrafo Acquity com uma coluna de fase reversa (Acquity UPCL HSS 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 100 mm—Waters Corporation, MA, USA) condicionada a 35 °C. Os solventes de eluição foram: A) H<sub>2</sub>O com Ácido fórmico 0.1% e B) Acetonitrila (ACN) com ácido fórmico 0.1%. A proporção de solventes foi mudando ao longo da corrida cromatográfica, iniciando em 95% de solvente A e 5% de B. O gradiente aumentou de forma linear para 75% A e 25% B nos próximos 6 minutos. Inverteu-se a polaridade para 25% A e 75% B por 6 minutos e, por fim 5% A e 95% B por um minuto. A corrida teve duração total de 14 minutos. Após a separação no cromatógrafo líquido, as amostras foram automaticamente injetadas e analisadas em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo - *time off light* (Q-TOF) Ultima API (Waters Corporation, MA, USA) de alta resolução, com ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo e negativo, nas seguintes condições: temperatura da fonte 150 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, voltagem de capilar de 3 kV e a voltagem do cone 35 V. O fluxo de nitrogênio no cone foi de 50 L/hr e de dessolvatação foi de 550 L/hr. Os espectros foram adquiridos na faixa de *m/z* 100-1200. O equipamento foi previamente calibrado com uma solução padrão de 0,05 mM de formiato de sódio em solução de ACN:H<sub>2</sub>O (90:10), que também foi usada como *lock-mass*, corrigindo os valores de *m/z* durante a corrida. O fluxo dos solventes foi de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>.

Os dados gerados foram pré-processados no *software* MassLynx 4.1 (Waters Corporation, MA, USA). Neste programa é feita a remoção de ruídos, alinhamento de picos, deconvolução, normalização pela contagem total de íons (TIC) e detecção de picos. Após esta etapa os dados da área de pico foram exportados para um arquivo Excel (Microsoft). Os íons que apresentaram valor igual a zero em 50% ou mais amostras dentro de cada grupo, tiveram todos os valores zerados, visando a eliminação de falsos-positivos. Os dados foram então analisados no *software* online Metaboanalyst 4.0 (CHONG, WISHART e XIA, 2019), transformados em log e escalonados por Pareto. Foram então realizadas análises de ANOVA e PCA. Os metabólitos que mais contribuíram para a separação dos grupos comparados foram direcionados para a fragmentação (MS/MS) e identificação.

A fragmentação foi realizada nas mesmas condições da fonte de ionização descritas anteriormente, utilizando energias de colisão entre 15 eV – 50 eV. Após fragmentados a procura pelos metabólitos foi realizada no banco de dados *Human Metabolome Database* (HMDB) utilizando-se um erro de massa de até 0.1 Da e

considerando o aduto de  $[M-H]^-$  para o modo negativo e  $[M+H]^+$  para o modo positivo. As estruturas das moléculas foram importadas e passaram por uma fragmentação *in silico* no programa *ACD/MS Structure ID suite* (ACD/labs, Toronto, Canadá) e o perfil de fragmentação de cada molécula, proposto pelo programa, foi comparado aos fragmentos gerados pelo MS/MS e a identificação dos metabólitos foi aceita ou refutada de acordo com a similaridade. Moléculas que apresentaram similaridade superior a 90% foram consideradas identificadas e moléculas com similaridade inferior a isso foram consideradas por sua classe.

### 3 RESULTADOS

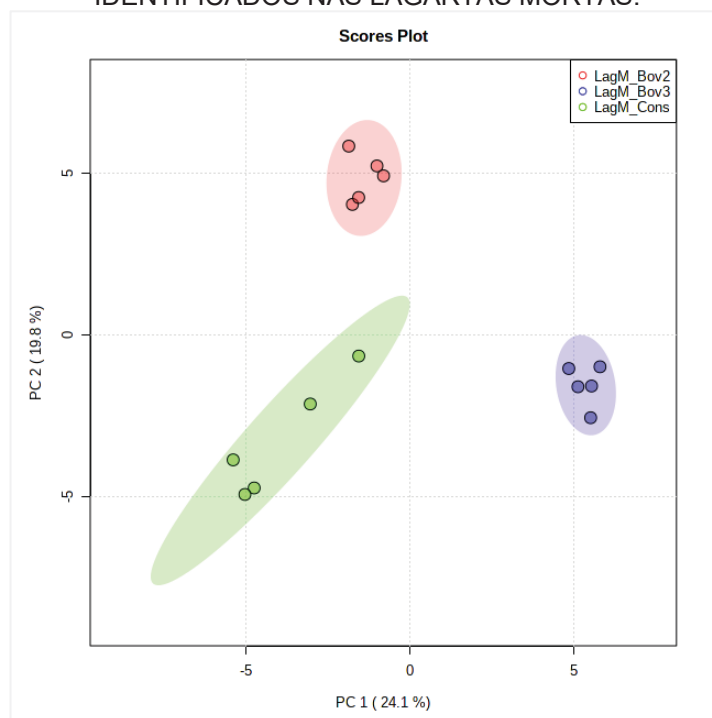
Os perfis metabólicos das condições listadas na Tabela 1 foram avaliados a fim de elucidar o modo de atuação do consórcio sobre lagartas de *D. fovealis* e o possível mecanismo de resistência utilizado pelas lagartas sobreviventes.

#### 3.1 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR GC-MS

##### 3.1.1 Lagartas mortas

Através da análise de GC-MS foi possível identificar 137 moléculas (APÊNDICE 1). A análise de PCA mostrou a formação de três *clusters* bem definidos, com a soma dos componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2) de 43.9 % (FIGURA 1), demonstrando uma tendência de separação nos grupos analisados e sem a presença de outliers. A ANOVA apontou 50 biomarcadores os quais foram submetidos a análise de correlação e estão representados pelo *heatmap* (FIGURA 2), dos quais 1 apresentou diferença estatística ( $p \leq 0.005$ ) por sua maior abundância em LagM\_Cons e 4 biomarcadores são únicos deste grupo (TABELA 2).

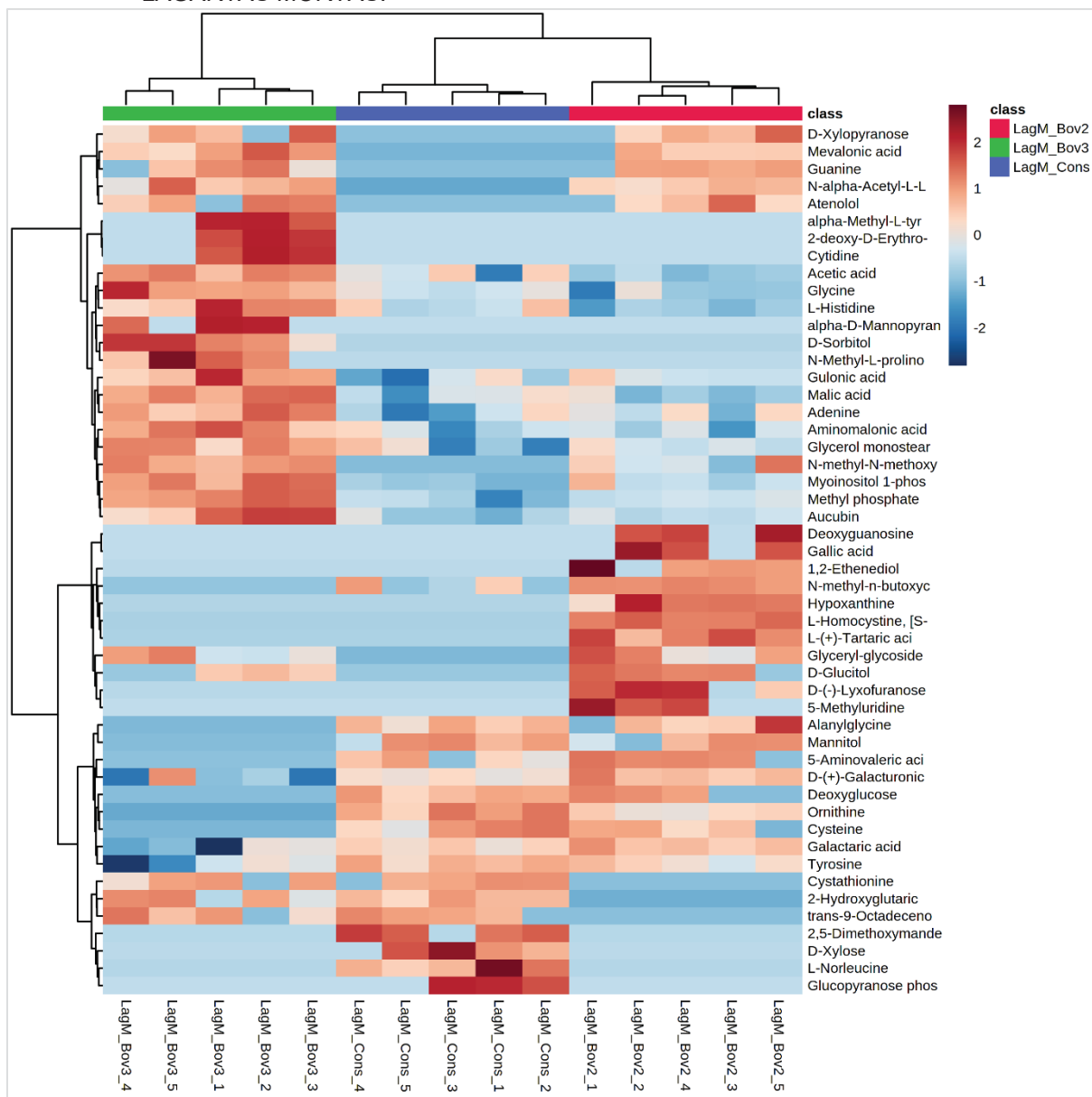
FIGURA 1 - 2-D SCORE PLOT DA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS NAS LAGARTAS MORTAS.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: LagM\_Bov2: lagartas mortas pela linhagem Bov 2; LagM\_Bov3: lagartas mortas pela linhagem Bov 3; LagM\_Cons: lagartas mortas pelo consórcio.

FIGURA 2 – HEATMAP DOS 50 BIOMARCADORES IDENTIFICADOS POR GC-MS NAS LAGARTAS MORTAS.



FONTE: A autora (2021)

TABELA 2. BIOMARCADORES MAIS ABUNDANTES OU ÚNICOS DO GRUPO LAGM\_CONS.

Nome do metabólito	Valor-f	Valor-p	$-\log_{10}(p)$	FDR	Abundância
Ornitina	93.664	4.76E-08	7.3223	2.14E-06	↑ LagM_Cons
Glucopirranose fosfato	-	-	-	-	Único de LagM_Cons
L-Norleucina	-	-	-	-	Único de LagM_Cons
Ácido 2,5-Dimetoximandélico	-	-	-	-	Único de LagM_Cons
D-Xilose	-	-	-	-	Único de LagM_Cons

FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Valor-f: razão entre variâncias; Valor-p.: probabilidade de significância;  $-\log_{10}(p)$ : Valor-p transformado por  $-\log_{10}$ ; FDR: *False Discovery Rate*; LagM\_Cons: lagartas mortas pelo consórcio.

Dentre estes metabólitos identificados, a ornitina e a L-norleucina são classificados como L-alfa-aminoácidos, sendo este segundo um aminoácido não-proteinogênico, a glucopiranosose fosfato e a D-xilose são monossacarídeos sendo que a glucopiranosose fosfato é classificada como um monossacarídeo fosfato e a D-xilose como uma pentose e o ácido 2,5 dimetoximandélico pertencente a classe dos benzenos e derivados (TABELA 3).

TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR GC-MS EM LAGM\_CONS, DE ACORDO COM AS BASES DE DADOS HMDB E PUBCHEM.

Metabolito	Classificação	Descrição
Ornithina	L-alfa-aminoácidos	Ornitina é um ácido pentanóico com dois grupamentos amina nas posições 2 e 5. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como L-alfa-aminoácidos, nos quais o carbono alfa está na conformação L.
L-Norleucina	L-alfa-aminoácidos	L-norleucina é um ácido hexanóico que possui um grupo amina em na posição 2. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como L-alfa-aminoácidos e é um aminoácido não proteinogênico
Glucopiranosose fosfato	Fosfato monossacarídeo	A glucopiranosose 1-fosfato é um glicose que possui um fosfato na posição 1. Tem um papel como metabólito fundamental. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como fosfatos monossacarídeos. São monossacarídeos que compreendem um grupo fosfatado ligado ao carboidrato.
D-xilose	Pentoses	Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como pentoses. Esses são monossacarídeos com cinco átomos de carbono.
Ácido 2,5-Dimethoxymandelic	Benzene and derivatives	Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como benzeno e derivados substituídos. Estes são compostos aromáticos contendo um anel monocíclico que consiste em benzeno.

FONTE: A autora (2021)

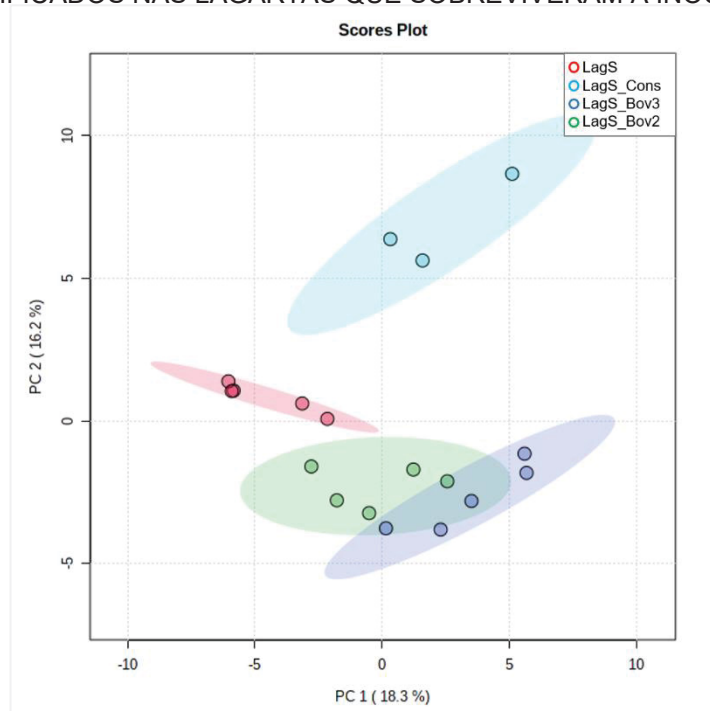
LEGENDA: LAGM\_CONS: lagartas mortas pelo consórcio; HMDB: *Human Metabolome Database*; PUBCHEM: *Open Chemistry database*.

### 3.1.2 Lagartas Sobreviventes

Nas lagartas sobreviventes foram identificadas 141 moléculas (APÊNDICE 2). PC1 e PC 2 somados, foram de 34.5 %, apresentando uma pequena sobreposição de metabólitos entre as lagartas que receberam aplicação dos fungos isoladamente (Bov

3 e Bov 2) (FIGURA 3). A ANOVA apontou 44 biomarcadores os quais foram submetidos a análise de *cluster* e estão representados pelo *heatmap* (FIGURA 4), sendo quatro com diferença estatística ( $p \leq 0.005$ ) por estarem mais abundantes nas lagartas que receberam aplicação de fungos e um biomarcador único das lagartas controle (TABELA 4).

FIGURA 3 - 2-D SCORE PLOT DA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO FÚNGICA.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: LagS\_BoV2: lagartas que sobreviveram a inoculação da linhagem Bov 2; LagS\_BoV3: lagartas que sobreviveram a inoculação da linhagem Bov 3; LagS\_BoV3: lagartas que sobreviveram a inoculação do consórcio;

TABELA 4 - BIOMARCADORES IDENTIFICADOS NAS LAGARTAS SOBREVIVENTES À APLICAÇÃO DOS FUNGOS.

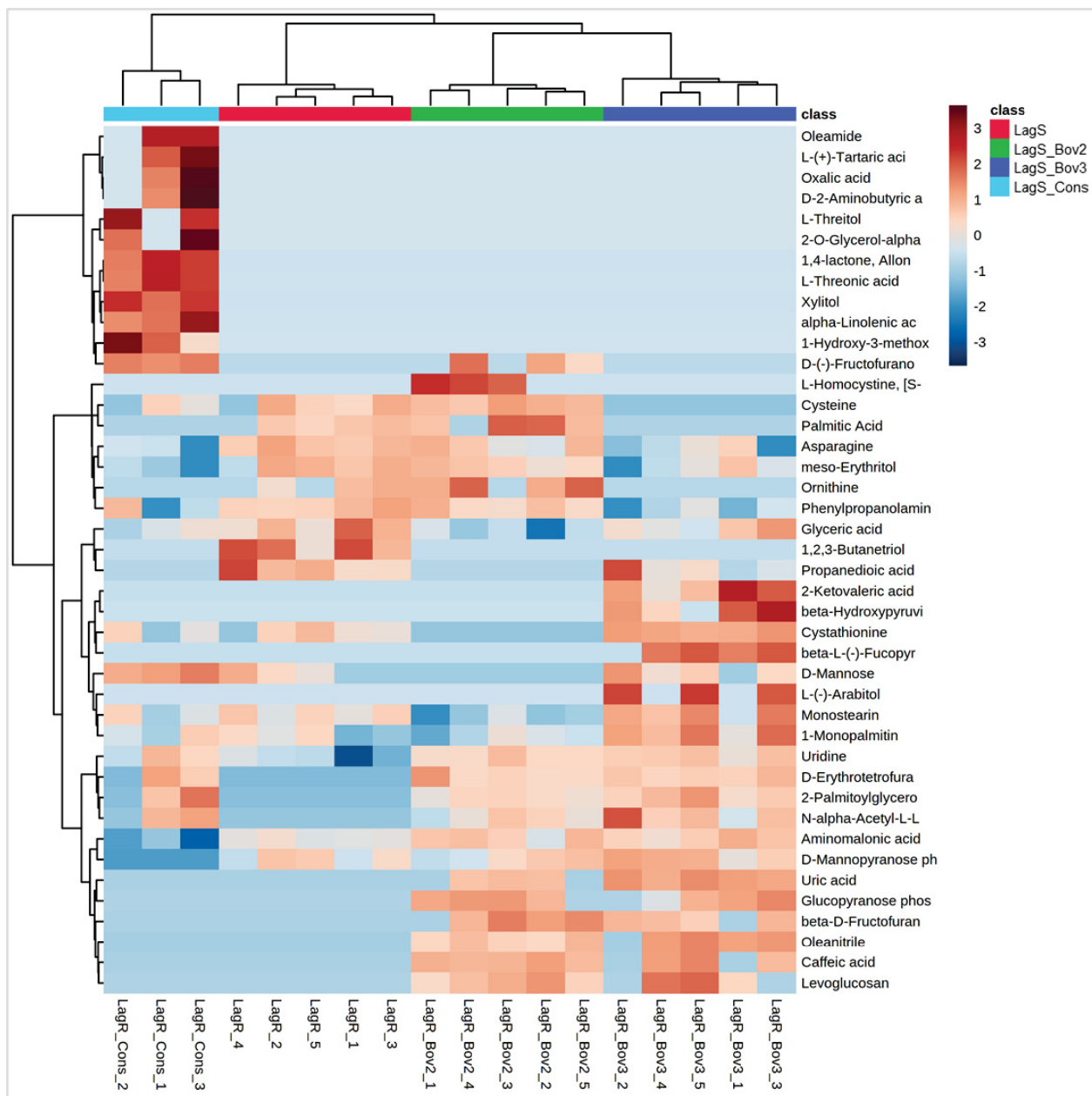
Nome do metabólito	Valor-f	Valor-p	$-\log_{10}(p)$	FDR	Abundância
2-Palmitoilglicerol	9.8723	9.35E-04	3.0292	0.00732	↑ LagS_BoV2, LagS_BoV3 e LagS_BoV3
D-Erythrotetofuranose	13.738	1.87E-04	3.7288	0.0023	↑ LagS_BoV2, LagS_BoV3 e LagS_BoV3
N-alfa-acetil-L-Lisina	6.4163	0.00586	2.2324	0.02949	↑ LagS_BoV2, LagS_BoV3 e LagS_BoV3
Uridina	6.6854	0.00499	2.3023	0.02603	↑ LagS_BoV2, LagS_BoV3 e LagS_BoV3
1,2,3-Butanetriol	-	-	-	-	Único de LagS

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: Valor-f: razão entre variâncias; Valor-p.: probabilidade de significância;  $-\log_{10}(p)$ : Valor-p transformado por  $-\log_{10}$ ; FDR: *False Discovery Rate*; LagS\_BoV2: : lagartas que sobreviveram a inoculação da linhagem Bov 2; LagS\_BoV3: lagartas que sobreviveram a inoculação da linhagem Bov 3; LagS\_BoV3: lagartas que sobreviveram a inoculação do consórcio.



FIGURA 4 – HEATMAP DOS 44 BIOMARCADORES IDENTIFICADOS POR GC-MS NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO FÚNGICA.



FONTE: A autora (2021)

Dentre eles 2-palmitoilglicerol é classificado como uma N-acilamina; a N-alfa-acetil-L-lisina pertence a classe dos N-acil-alfa aminoácidos; a uridina é classificada como um nucleotídeo pirimídico e o 1,2,3-Butanotriol pertence a classe dos álcoois secundários (TABELA5). Não foi encontrada classificação para o metabólito D-eritrotetrofuranose nos bancos de dados consultados (HMDB e PubChem).

TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR GC-MS NAS LAGARTAS SOBREVIVENTES À APLICAÇÃO DOS FUNGOS, DE ACORDO COM AS BASES DE DADOS HMDB E PUBCHEM.

Metabolito	Classificação	Descrição
2-Palmitoilglicerol	N-acilaminas	2-palmitoilglicerol é um monoglicerídeo em que o grupo acil é hexadecanoil (palmitoil). Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como N-acilaminas. As N-acilaminas são compostos que contêm um ácido graxo ligado a um grupo amina por meio de uma ligação éster.
N-alfa-Acetil-L-Lisina	N-acil-alfa aminoácidos	Acetil-L-lisina onde o grupo acetil está localizado na posição N-2. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como n-acil-alfa aminoácidos. Estes são alfa-aminoácidos que carregam um grupo acila em seu átomo de nitrogênio terminal.
Uridina	Nucleosídeos pirimídicos	A uridina é um nucleosídeo que consiste em uma uracila ligada à uma D-ribose. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como nucleotídeos pirimídios. Esses são compostos que compreendem uma base pirimídica ligada a uma porção ribosil ou desoxirribosil.
1,2,3-Butanotriol	Álcoois secundários	Derivado do butano que possui três hidroxilas nas posições 1, 2 e 3. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como álcoois secundários. Álcoois secundários são compostos que contêm um grupo funcional de álcool secundário.
D-Eritrotetrofuranose	-	-

FONTE: A autora (2021)

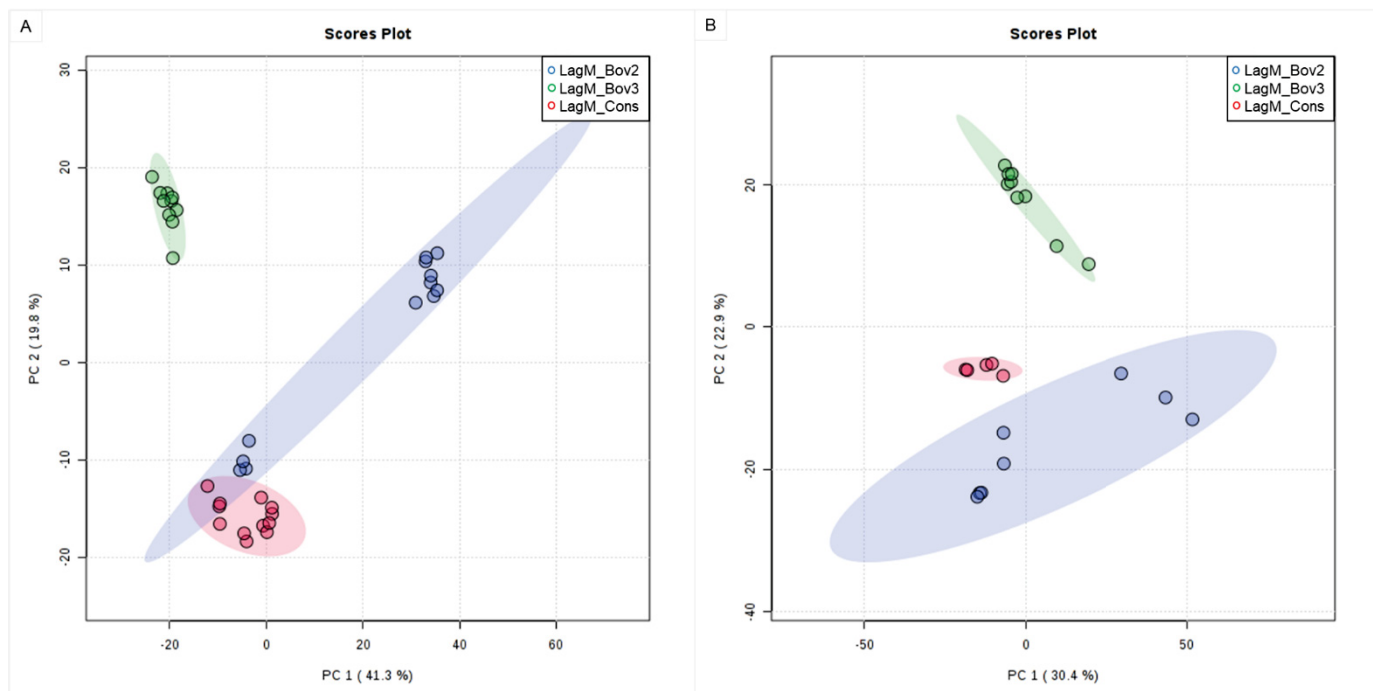
LEGENDA: HMDB: *Human Metabolome Database*; PUBCHEM: *Open Chemistry database*

## 3.2 LC-MS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 3.2.1 Lagartas mortas

Através da LC-MS foram obtidas um total de 137 moléculas no modo negativo e 174 no modo positivo. Na análise de PCA, assim como observado para os dados de GC-MS, pudemos observar uma tendência de separação entre os grupos analisados, cada um formado pelo seu próprio *cluster* de metabólitos (FIGURA 5A e B). A pequena sobreposição entre LagM\_C e LagM\_F2, no modo positivo, demonstra que os metabólitos identificados nestes dois grupos são mais próximos, inclusive alguns são compartilhados, entretanto a maioria dos metabólitos é diferente e não há presença de outliers. PC1 e PC2 somados, foram de 59,4 % e 53,3% para os modos positivo e negativo, respectivamente.

FIGURA 5 -2-D SCORES PLOT DA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS METABÓLITOS DETECTADOS POR LC-MS NAS LAGARTAS MORTAS.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: A) Modo negativo;

B) Modo positivo. LagM\_Bov2: lagartas mortas pela linhagem Bov 2; LagM\_Bov3: lagartas mortas pela linhagem Bov 3; LagM\_Cons: lagartas mortas pelo consórcio.

A ANOVA resultou em 63 biomarcadores nos modos positivo e negativo, sendo 50 únicos das LagM\_Cons (TABELA 6). As 50 moléculas únicas de LagM\_Cons seguiram para a etapa de fragmentação e identificação.

TABELA 6 – BIOMARCADORES DAS LAGARTAS MORTAS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE FRAGMENTAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO. CONTINUA.

TR corrigido (min)	Massa/carga ( $m/z$ )	Grupo de identificação
2.690856	884.4371	LagM_Cons
2.902212	420.1776	LagM_Cons
3.227796	868.4412	LagM_Cons
3.418632	493.195	LagM_Cons
3.58758	446.2485	LagM_Cons
3.940524	1046.4935	LagM_Cons
4.029444	1030.4977	LagM_Cons
4.09032	195.0292	LagM_Cons
4.361868	479.0758	LagM_Cons
4.369392	955.1429	LagM_Cons
4.422744	595.1226	LagM_Cons
4.491144	1025.4933	LagM_Cons
4.58964	836.3912	LagM_Cons

TABELA 6 – BIOMARCADORES DAS LAGARTAS MORTAS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE FRAGMENTAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO. CONCLUSÃO.

TR corrigido (min)	Massa/carga ( <i>m/z</i> )	Grupo de identificação
4.604688	834.3773	LagM_Cons
4.616316	578.3272	LagM_Cons
4.6341	449.2006	LagM_Cons
4.798944	965.4817	LagM_Cons
4.800312	662.3502	LagM_Cons
4.886496	537.1804	LagM_Cons
4.898124	622.3545	LagM_Cons
5.070492	706.376	LagM_Cons
5.154624	666.3818	LagM_Cons
5.28048	349.1904	LagM_Cons
5.310576	750.4048	LagM_Cons
5.528772	371.2022	LagM_Cons
5.570496	429.1738	LagM_Cons
5.738076	768.4129	LagM_Cons
5.738076	393.2127	LagM_Cons
5.952852	415.2251	LagM_Cons
6.14916	437.241	LagM_Cons
6.332472	459.2558	LagM_Cons
6.502788	481.2702	LagM_Cons
6.930972	711.3948	LagM_Cons
7.785972	583.2977	LagM_Cons
8.554788	1157.6131	LagM_Cons
8.771616	607.3087	LagM_Cons
9.452196	447.132	LagM_Cons
9.586944	535.2724	LagM_Cons
10.089	937.501	LagM_Cons
10.104732	409.1714	LagM_Cons
10.570536	721.3643	LagM_Cons
10.682028	474.2583	LagM_Cons
10.79352	1164.6797	LagM_Cons
10.794888	1142.6854	LagM_Cons
11.345508	481.2715	LagM_Cons
11.760696	297.2267	LagM_Cons
11.931696	599.3196	LagM_Cons
11.933748	478.2924	LagM_Cons
11.982996	522.2834	LagM_Cons
12.95838	1013.5631	LagM_Cons

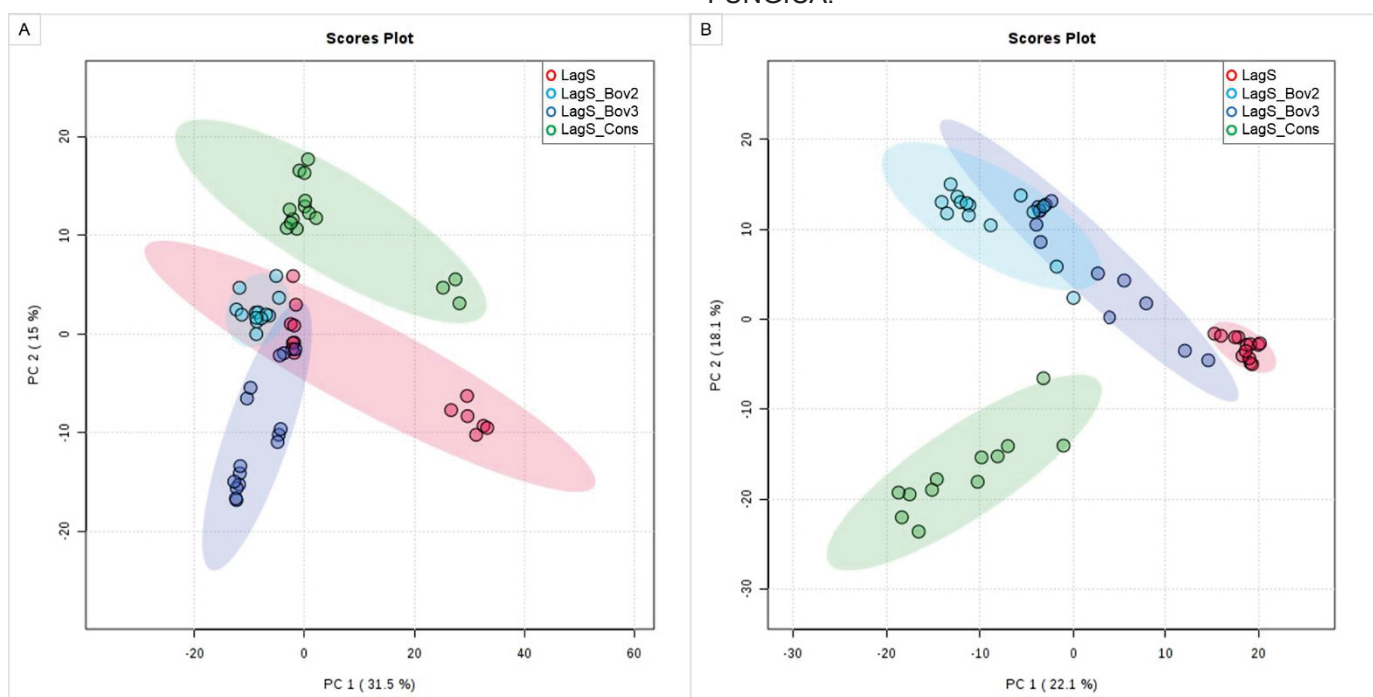
FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: LagM\_Cons: lagartas mortas pelo consórcio.

### 3.2.2 Lagartas Sobreviventes

Nas lagartas sobreviventes um total de 148 moléculas no modo negativo e 111 no modo positivo. Na análise de PCA a soma de PC1 e PC2 foi de 46.5 % e 40.2 % nos modos positivo e negativo, respectivamente (FIGURA 6A e B). Em ambos os modos, o grupo mais afastado foi o LagS\_Cons, com um *cluster* de metabólitos mais distinto das demais condições.

FIGURA 6 - 2-D SCORES PLOT DA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS METABÓLITOS DETECTADOS POR LC-MS NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO FÚNGICA.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: LagS\_Bov2: lagartas que sobreviveram a inoculação da linhagem Bov 2; LagS\_Bov3: lagartas que sobreviveram a inoculação da linhagem Bov 3; LagS\_Cons: lagartas que sobreviveram a inoculação do consórcio; LagS: lagartas controle.

A ANOVA identificou 30 biomarcadores nos modos positivo e negativo, sendo 25 únicos das lagartas que receberam aplicação dos fungos e 5 presentes em todos os grupos, quatro deles mais abundantes nas lagartas que receberam os fungos e um mais abundante na lagarta controle (TABELA 7). As 30 moléculas seguiram para a etapa de fragmentação e identificação

TABELA 7 – BIOMARCADORES DAS LAGARTAS SOBREVIVENTES SELECIONADOS PARA A ETAPA DE FRAGMENTAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO.

RT (min)	Massa/carga (m/z)	Grupo de Identificação
3.023964	377.1404	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
3.05748	421.1342	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
3.781152	461.1647	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
4.053384	247.1168	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
4.080744	300.9984	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
4.797576	665.3016	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
4.886496	537.1804	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
5.282532	661.3293	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
5.39676	710.4102	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
5.436432	745.3499	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
5.527404	705.3553	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
5.658048	789.3763	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
5.734656	428.2385	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
5.74902	749.3814	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
7.504848	721.3573	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
7.5069	1079.5586	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
8.126604	759.3723	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
8.482968	549.3418	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
8.572572	1135.6262	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
8.61156	399.1456	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
8.820864	755.4501	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
9.156708	862.4469	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
9.156708	1135.6274	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
9.645084	420.2471	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
10.511712	765.3593	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
10.718964	518.2507	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
10.874916	663.4106	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
11.565072	364.2459	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
11.987784	334.2332	LagS_Bov2, LagS_Bov3 e LagS_Cons
9.029484	611.2974	LagS

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: LagS: lagartas controle; LagS\_Bov2: lagartas que sobreviveram a inoculação da linhagem Bov 2; LagS\_Bov3: lagartas que sobreviveram a inoculação da linhagem Bov 3; LagS\_Cons: lagartas que sobreviveram a inoculação do consórcio;

### 3.3 FRAGMENTAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS

As moléculas selecionadas foram submetidas à fragmentação e análise *in silico* para possível identificação utilizando o banco de dados HMDB e o *software* ACD/MS Structure ID suite.

### 3.3.1 Lagartas mortas

Dos 50 biomarcadores das lagartas mortas, 41 foram identificados com diferentes similaridades e 9 não apresentaram similaridade com nenhum metabólito do banco (TABELA 8). Dezesesseis metabólitos apresentaram similaridade maior que 90% e foram considerados identificados (FIGURA 7). Os demais, que apresentaram similaridade de 89% ou menos, foram considerados parcialmente identificados, levando-se em consideração a classe à qual o metabólito pertence.

Foram identificadas quinze classes no grupo LagM\_Cons sendo a dos Glicerofosfolipídios (38%) a mais representativa, seguida pelos Compostos organooxigenados (8%) e Lipídios de Prenol (8%), as demais classes representaram entre 4 e 2% do total de metabólitos identificados neste grupo e 18% não foram identificados (FIGURA 8).

TABELA 8 – METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR MS/MS NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO. CONTINUA.

RT (min)	Massa/carga (m/z)	Classe	Metabólito	ESI	Cód. HMDB	ID (%)
2.690856	884.4371	GFL	PS(22:4/22:5)	(-)	HMDB0112811	94%
2.902212	420.1776	ISO	Hericerina	(+)	HMDB0038587	73%
3.227796	868.4412	GFL	PE-NMe2(44:9)	(-)	HMDB0114571	92%
3.58758	446.2485	AC	N-Oleoil tirosina	(+)	HMDB0062337	95%
3.940524	1046.494	GFL	CDP-DG(i-21:0/18:2)	(-)	HMDB0116312	88%
4.029444	1030.498	GFL	CDP-DG(16:0/22:3)	(-)	HMDB0006975	85%
4.09032	195.0292	ACN	Ácido 3- (2,4,5-trihidroxifenil) prop-2-enóico	(-)	HMDB0132521	72%
4.361868	479.0758	COOX	Neoglucobrassicina	(+)	HMDB0038384	79%
4.369392	955.1429	LP	PRE	(-)	HMDB0041300	73%
4.422744	595.1226	FL	Epicatequina- (4beta-> 8) - galocatequina	(+)	HMDB0036303	79%
4.58964	836.3912	GFL	PE(22:6/22:6)	(+)	HMDB0009705	87%
4.616316	578.3272	GFL	LPC(22:1)	(+)	HMDB0010399	55%
4.6341	449.2006	LP	Geranilgeranil difosfato	(-)	HMDB0004486	90%
4.798944	965.4817	GFL	PIP(16:0/22:4)	(-)	HMDB0009922	68%
4.800312	662.3502	GFL	PE-NMe2(28:1)	(+)	HMDB0113899	70%
4.898124	622.3545	GFL	6- (N-acetil-alfa-D-glucosaminil) -1-fosfatidil-1D-mio-inositol	(+)	HMDB0011669	65%
5.070492	706.376	AC	Fumonisina B2	(+)	HMDB0034703	75%
5.154624	666.3818	COOX	Natamicina	(+)	HMDB0014964	69%
5.28048	349.1904	COOX	(1S, 2S, 4S) -1,8-Epoxi-p-mentano-2,7-diol 2-O-b-D-glucosídeo	(+)	HMDB0034786	84%
5.310576	750.4048	GFL	Fosfatidilserina	(+)	HMDB0112372	69%

TABELA 8 – METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR MS/MS NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO. CONCLUSÃO

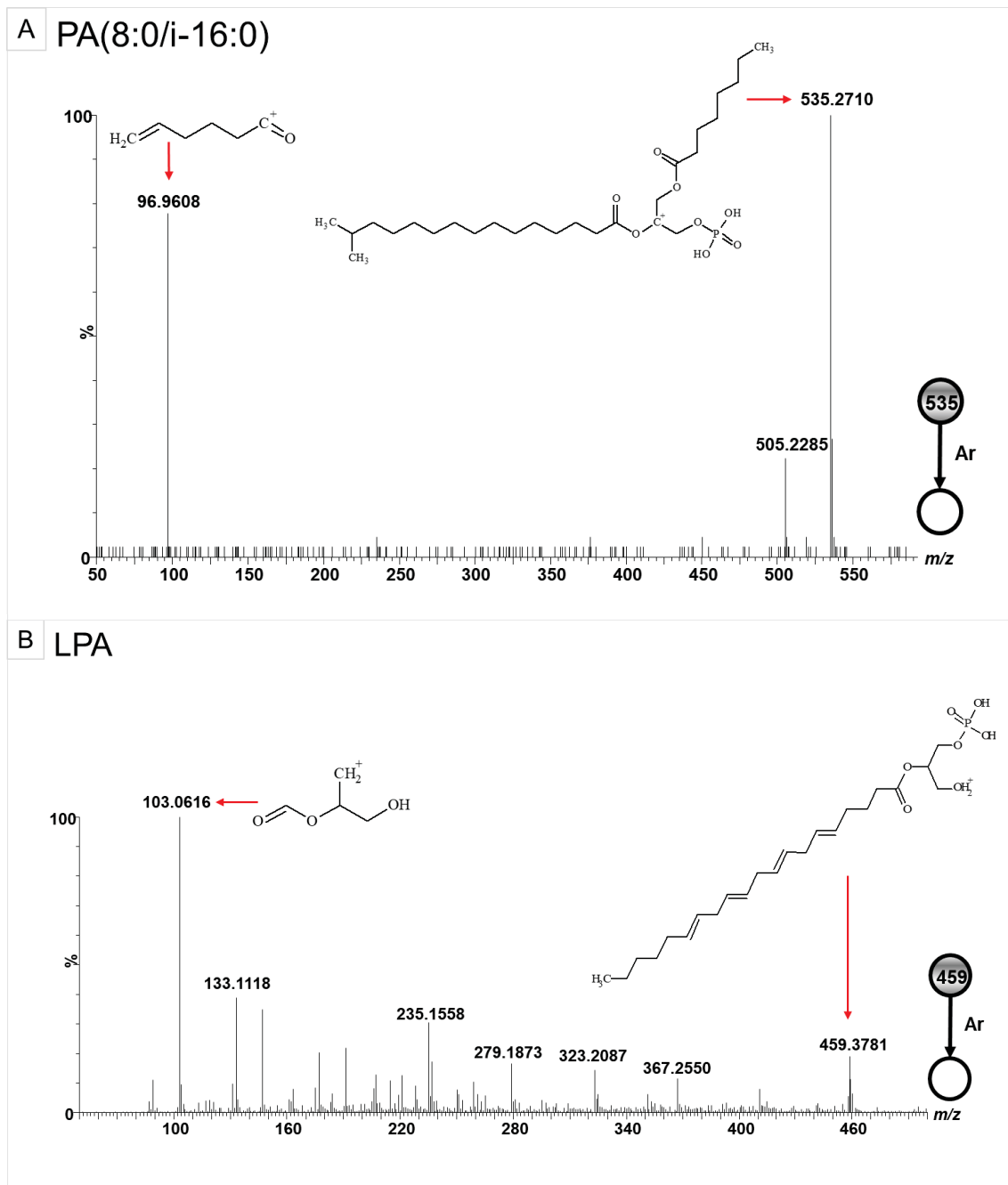
RT (min)	Massa/carga (m/z)	Classe	Metabólito	ESI	Cód. HMDB	ID (%)
5.528772	371.2022	2-AFL	Licarina C	(+)	HMDB0033319	82%
5.570496	429.1738	GFL	LPA(18:4)	(-)	HMDB0114745	81%
5.738076	393.2127	FL	Glabrol	(+)	HMDB0029531	90%
5.738076	768.4129	PPM	Pentagastrina	(+)	HMDB0014329	89%
5.952852	415.2251	BD	Diltiazem	(+)	HMDB0014487	97%
6.14916	437.241	COOX	alquil-DHAP	(+)	HMDB0011133	93%
6.332472	459.2558	GFL	LPA	(+)	HMDB0012496	95%
6.502788	481.2702	GFL	LPA	(+)	HMDB0062317	93%
6.930972	711.3948	LP	19'-Hexanoiloximtiloxantina	(-)	HMDB0037045	93%
7.785972	583.2977	AZO	[(16R)-5,7-dihidroxi-8,8,10,16-tetrametil-3-[1-(2-metil-1,3-tiazol-4-il) prop-1-en-2-il Ácido]-12-metilideno-9-oxo-17-oxa-4-azabicyclo [14.1.0] heptadec-4-en-11-il] oxidanossulfônico	(-)	HMDB0127605	85%
9.452196	447.132	BP	Artonol E	(+)	HMDB0030490	61%
9.586944	535.2724	GFL	PA(8:0/i-16:0)	(-)	HMDB0115689	96%
10.089	937.501	GFL	1-Eicsoat0	(-)	HMDB0010019	72%
10.10473	409.1714	BZ	Tansulosina	(+)	HMDB0014844	92%
10.57054	721.3643	EST	Ofiopogonina C'	(-)	HMDB0029312	58%
10.68203	474.2583	GFL	LPE(18:3)	(-)	HMDB0011509	94%
11.7607	297.2267	FE	Juvocimeno 2	(-)	HMDB0040644	98%
11.9317	599.3196	GFL	1-estearoil-GPI	(-)	HMDB0240261	82%
11.93375	478.2924	GFL	LPE(18:1)	(-)	HMDB0011475	90%
11.983	522.2834	GFL	LisoPS(18:1(9Z)/0:0)	(-)	HMDB0240603	93%
12.95838	1013.563	LP	Quinquenósido I	(-)	HMDB0032814	35%
3.418632	493.195	NI	NI	(-)	NI	NI
4.491144	1025.493	NI	NI	(-)	NI	NI
4.604688	834.3773	NI	NI	(+)	NI	NI
4.886496	537.1804	NI	NI	(-)	NI	NI
8.554788	1157.613	NI	NI	(-)	NI	NI
8.771616	607.3087	NI	NI	(-)	NI	NI
10.79352	1164.68	NI	NI	(-)	NI	NI
10.79489	1142.685	NI	NI	(-)	NI	NI
11.34551	481.2715	NI	NI	(-)	NI	NI

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: TR: tempo de retenção; Cód. HMDB: código no *Human Metabolome Database*; ID: Similaridade com o banco de dados; ESI: *electrospray*; GFL: Glicerofosfolipídios; COOX: Compostos organooxigenados; LP: Lipídios de Prenol; FE: Fenol Éter; AC: Ácidos Carboxílicos; PPM: Peptidomiméticos; FL: Flavonoides; 2-AFL: 2-arylbenzofuran flavonoides; ISOL: Isoindóis e derivados; BD: Benzodiazepinas; BZ: Benzeno e derivados; EST: Esteróides e derivados; AZO: Azóis; ACN: Ácido cinâmico e derivados; BP: Benzopiranos; NI: Não identificado.



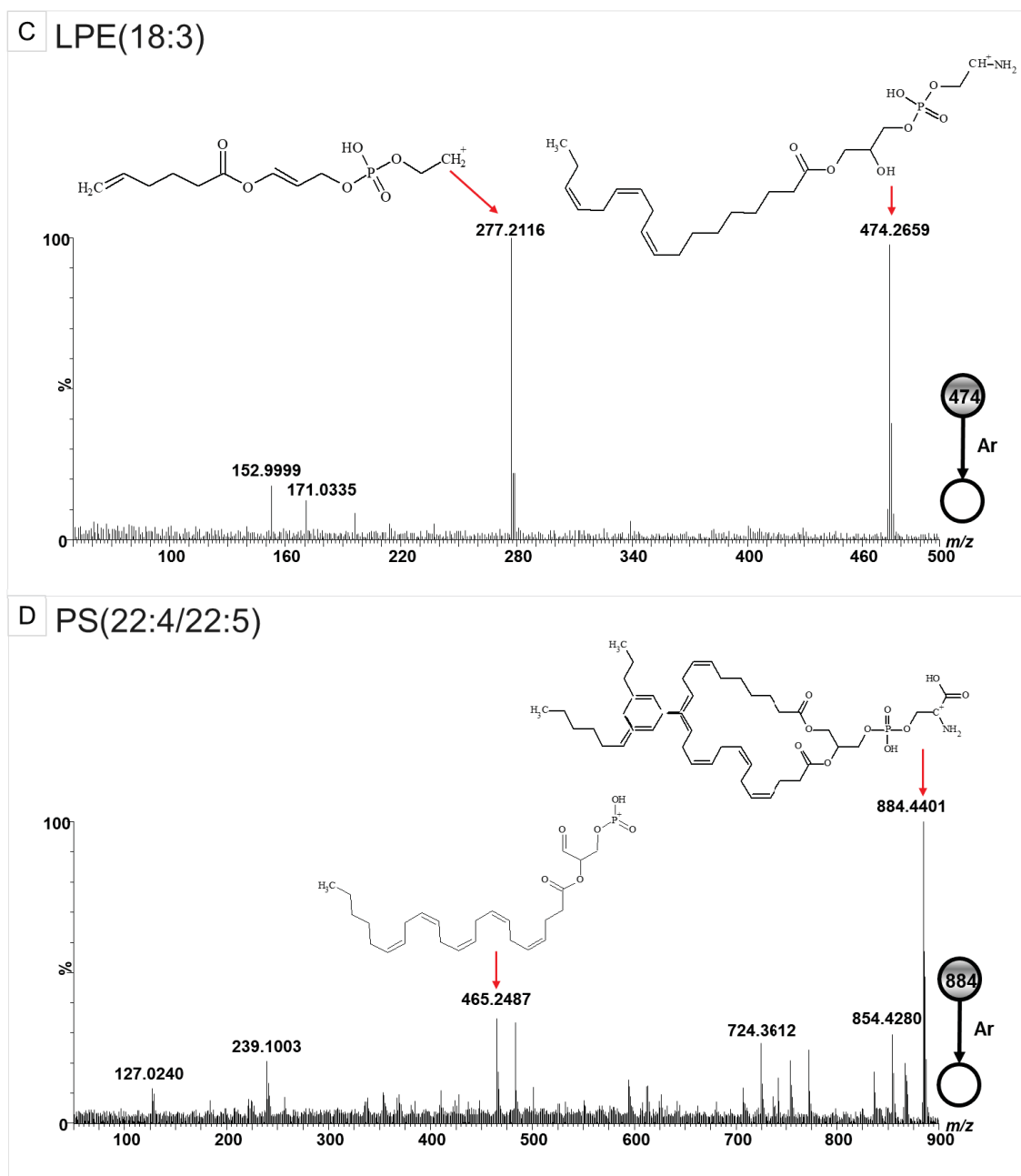
FIGURA 7 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO. CONTINUA.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: A)  $[M-H]^-$  de PA(8:0/i-16:0) ( $m/z$  535) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.  
B)  $[M+H]^+$  de LPA ( $m/z$  459) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.

FIGURA 7 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.

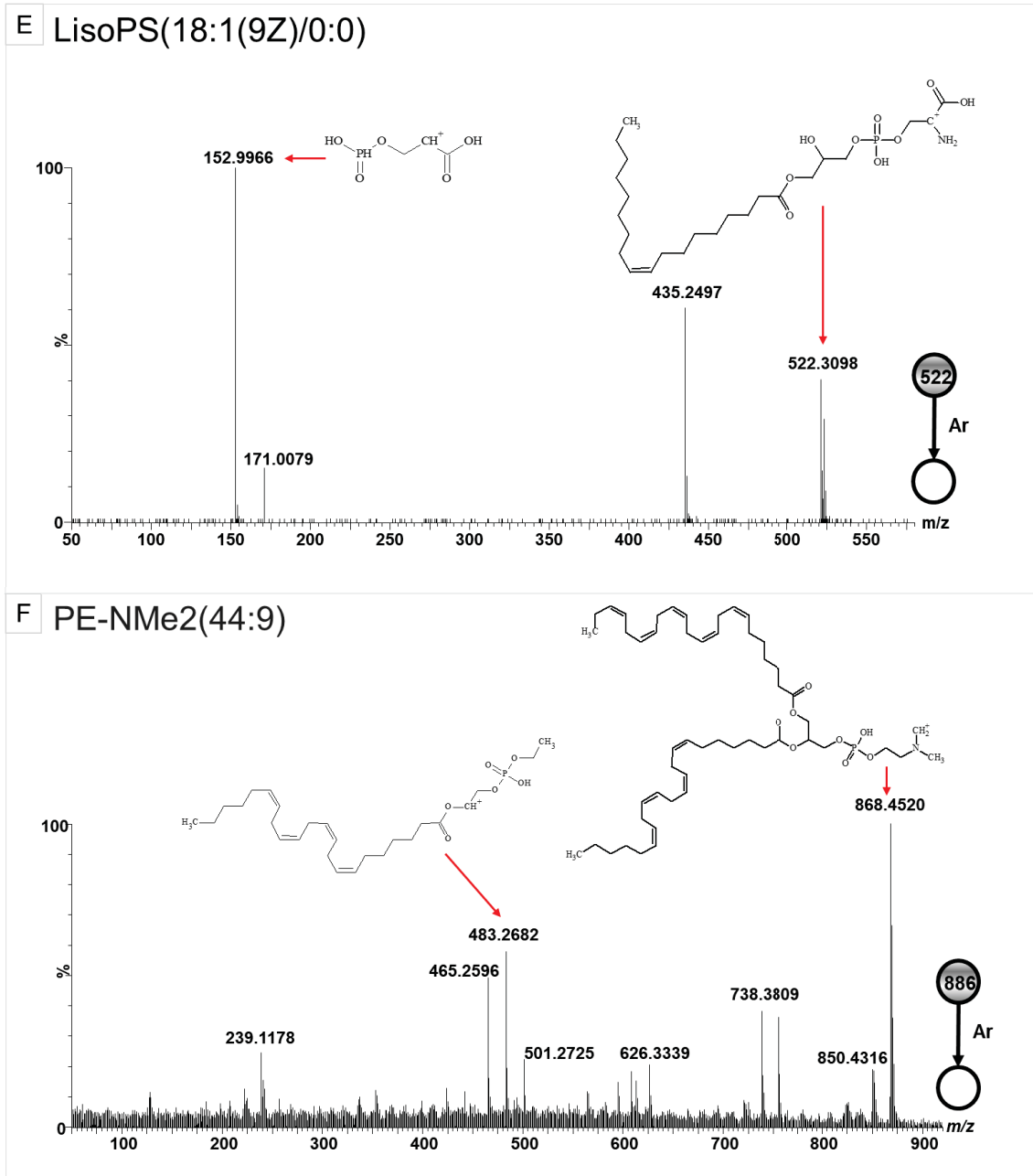


FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: C) [M-H]<sup>-</sup> de LPE(18:3) ( $m/z$  474) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.

D) [M-H]<sup>-</sup> de PS(22:4/22:5) ( $m/z$  884) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.

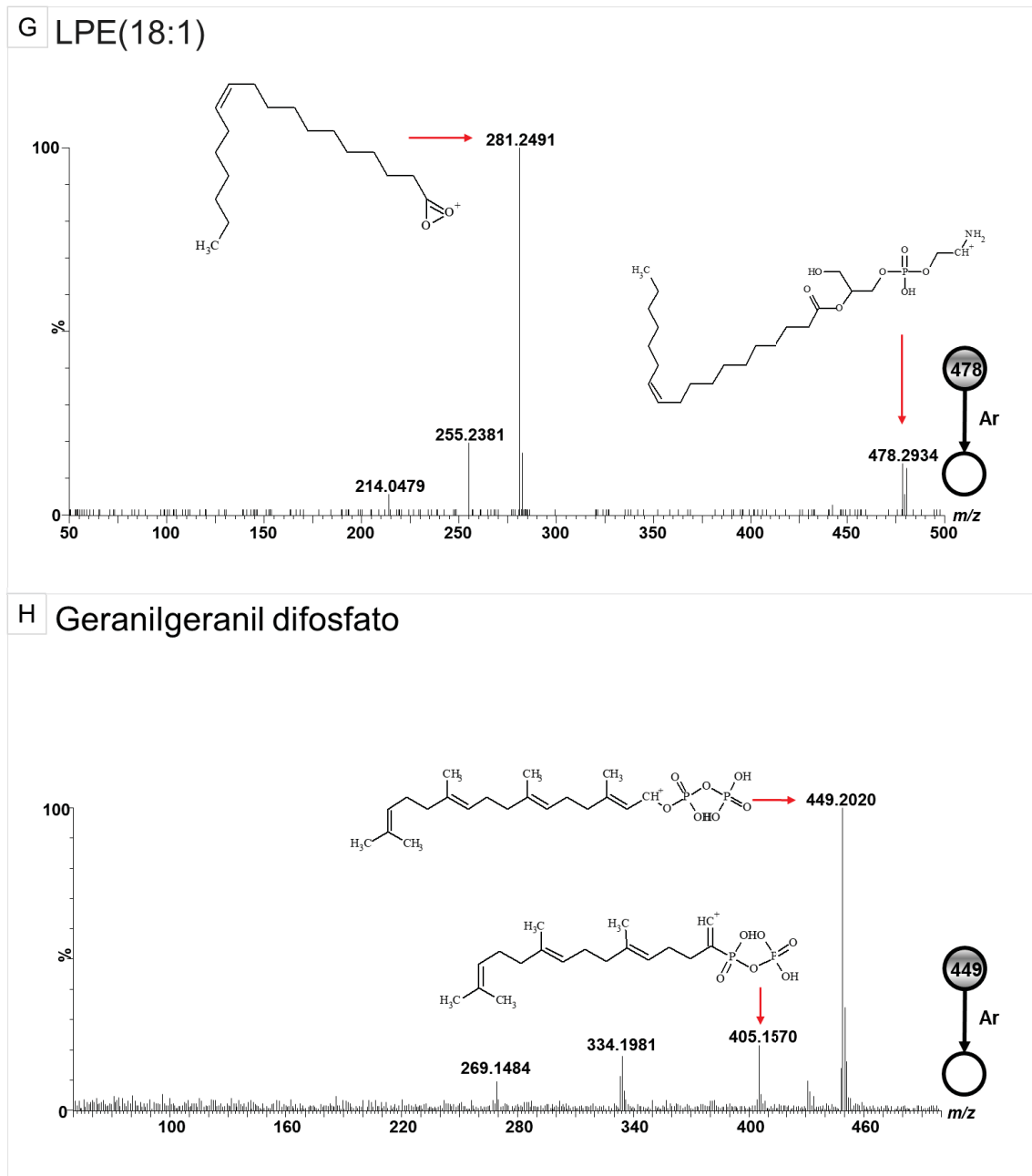
FIGURA 7 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: E)  $[M-H]^-$  de LisoPS(18:1(9Z)/0:0) ( $m/z$  522) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.  
F)  $[M-H]^-$  de PE-NMe2(44:9) ( $m/z$  868) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.

FIGURA 7 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.

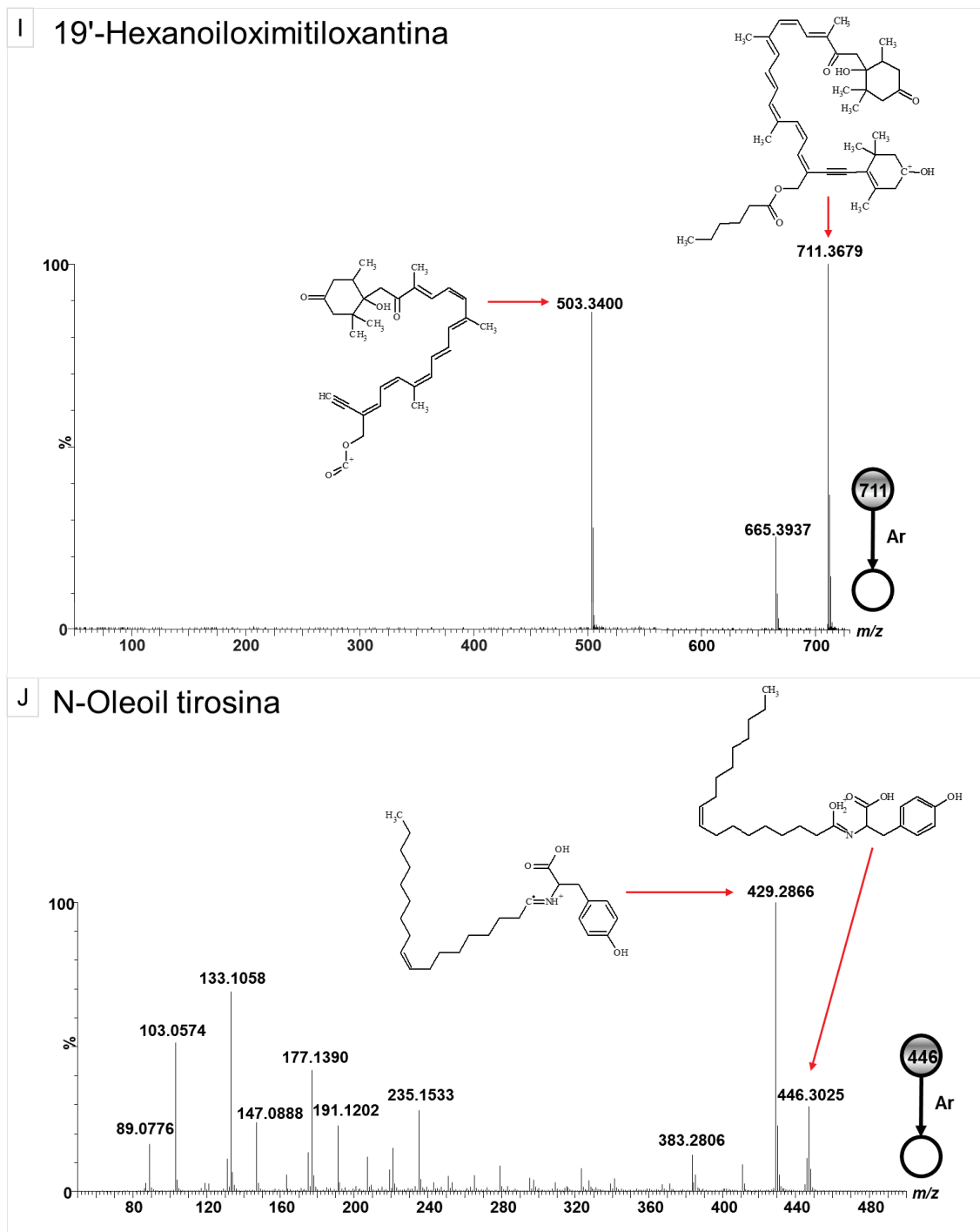


FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: G)  $[M-H]^-$  de LPE(18:1) ( $m/z$  478) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.

H)  $[M-H]^-$  de Geranilgeranil difosfato ( $m/z$  449) pertencente a classe dos Lipídios de Prenol.

FIGURA 7 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.

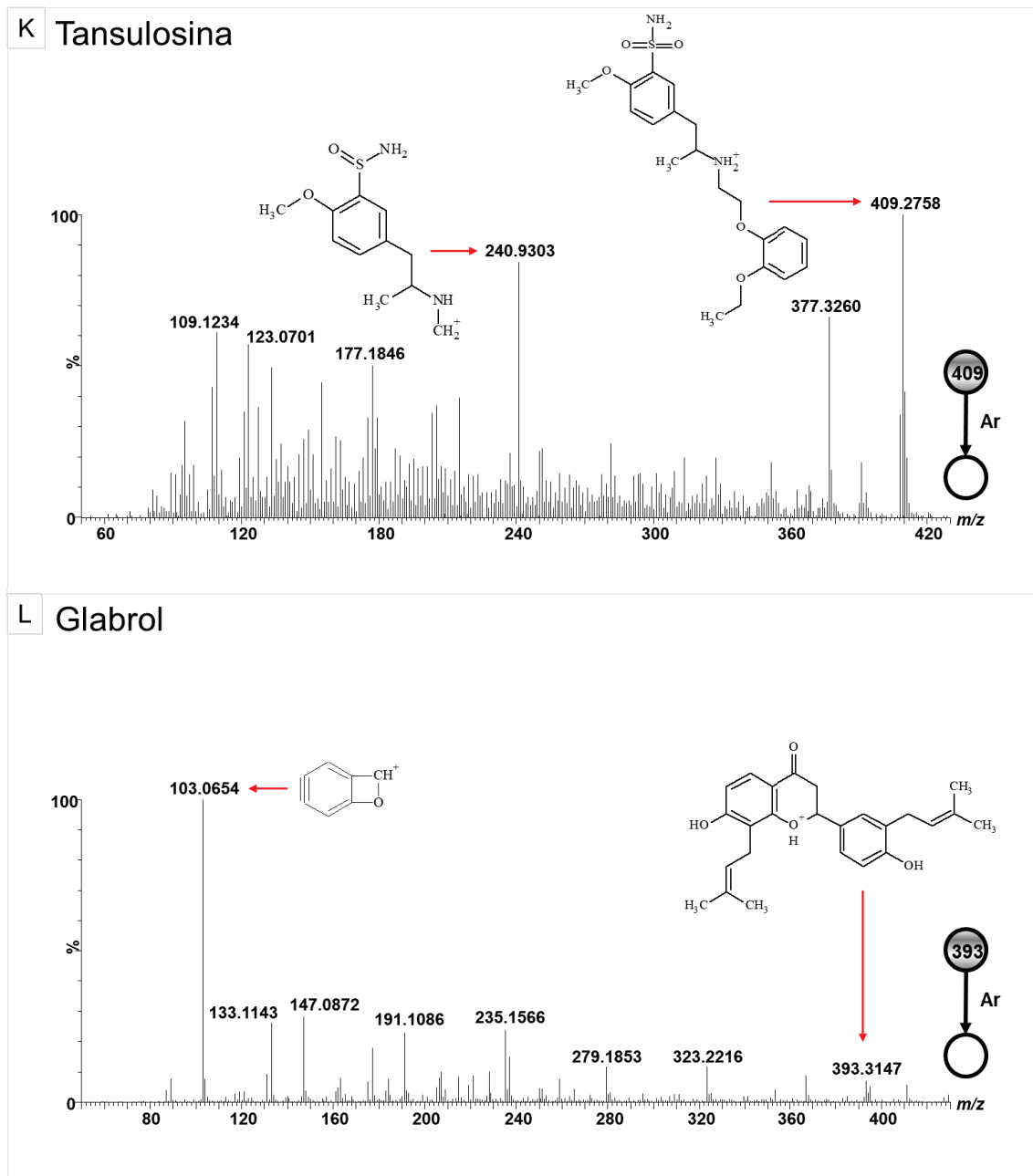


FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: I)  $[M-H]^-$  de 19'-Hexanoiloximitiloxantina ( $m/z$  711) pertencente a classe dos Lipídios de Prenol.

J)  $[M+H]^+$  de N-Oleoil tirosina ( $m/z$  446) pertencente a classe dos Ácidos Carboxílicos.

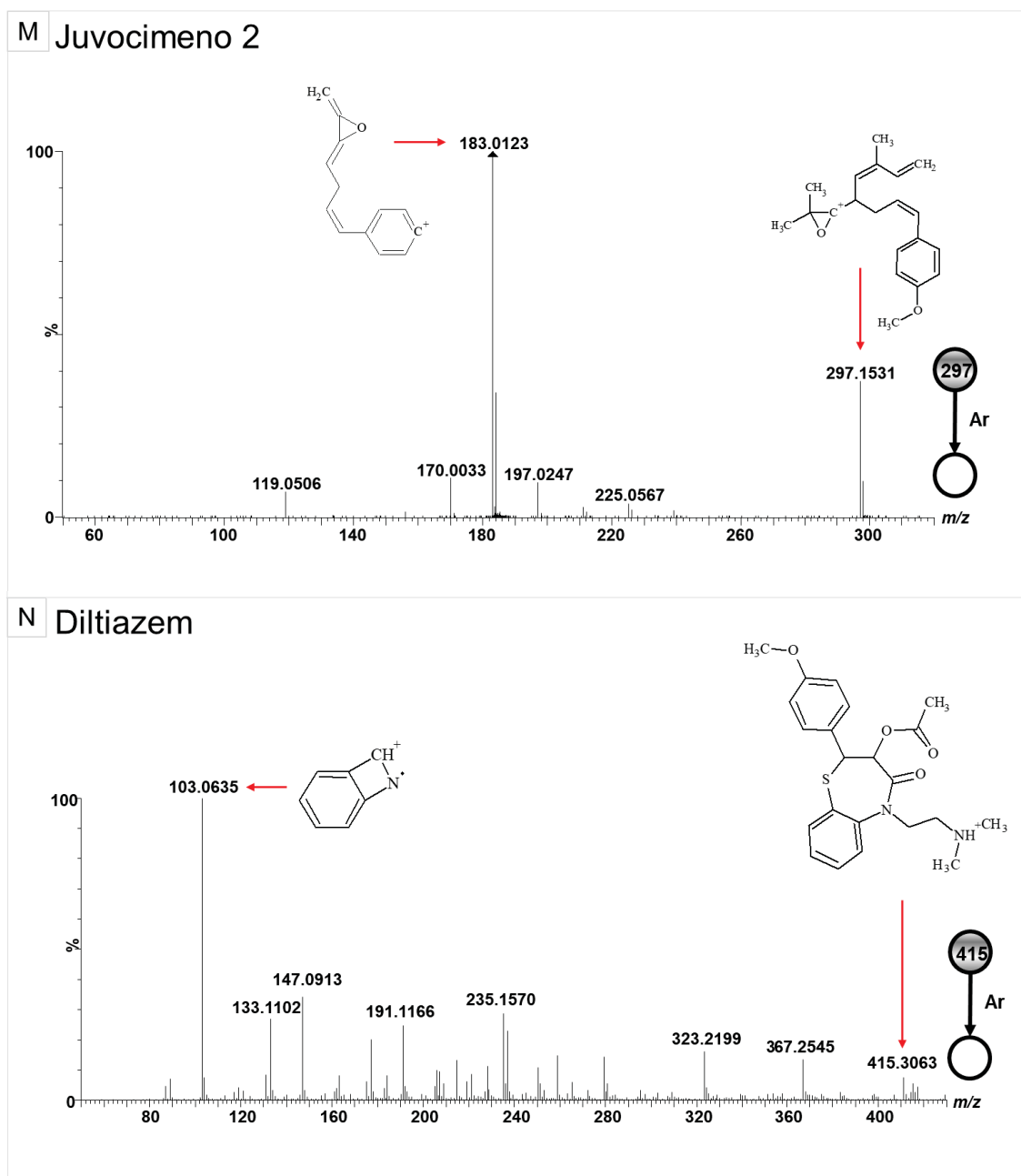
FIGURA 7 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO. CONTINUAÇÃO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: K)  $[M+H]^+$  de Tansulosina ( $m/z$  409) pertencente a classe dos Benzenos.  
L)  $[M+H]^+$  de Glabrol ( $m/z$  393) pertencente a classe dos Flavonoides.

FIGURA 7 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO. CONCLUSÃO.

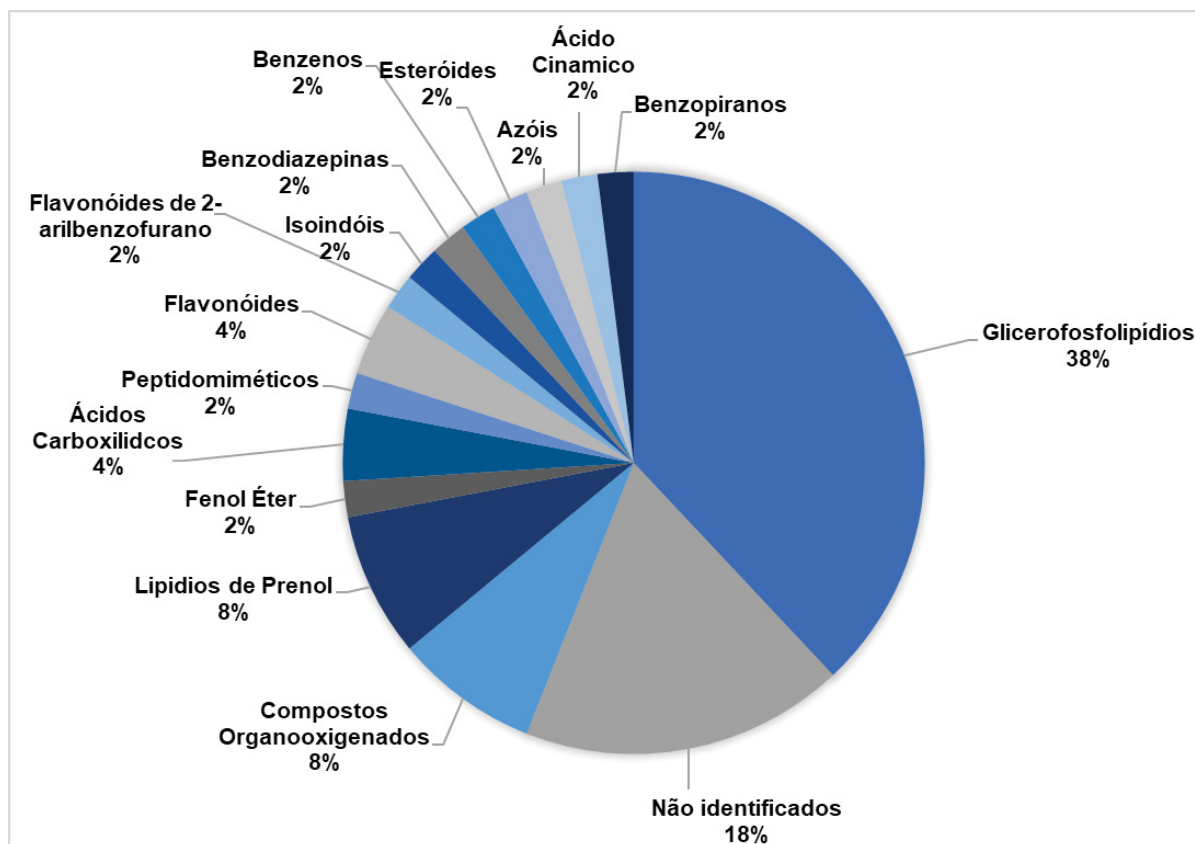


FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: M)  $[M-H]^-$  de Juvocimeno 2 ( $m/z$  297) pertencente a classe dos Fenol Eter.

N)  $[M+H]^+$  de Diltiazem ( $m/z$  415) pertencente a classe das Benzodiazepinas.

FIGURA 8 – CLASSES DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS NAS LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO.



FONTE: A autora (2021)

### 3.3.2 Lagartas Sobreviventes

Nas lagartas sobreviventes, das 30 moléculas fragmentadas foram identificados 25 metabólitos com diferentes similaridades e 5 não apresentaram similaridade com nenhum metabólito do banco (TABELA 9). Quinze metabólitos apresentaram similaridade maior que 90% e foram considerados identificados (FIGURA 9). Os demais foram parcialmente identificados, levando em conta a classe à qual o metabólito pertence. Foram identificadas doze classes de metabólitos, sendo a classe mais representativa a dos Glicerofosfolípidios (31%), seguida pelos Lipídios de Prenol e Acil graxos (10%), as demais classes representaram entre 6 e 3% do total de metabólitos e 17% não foram identificados (FIGURA 10).



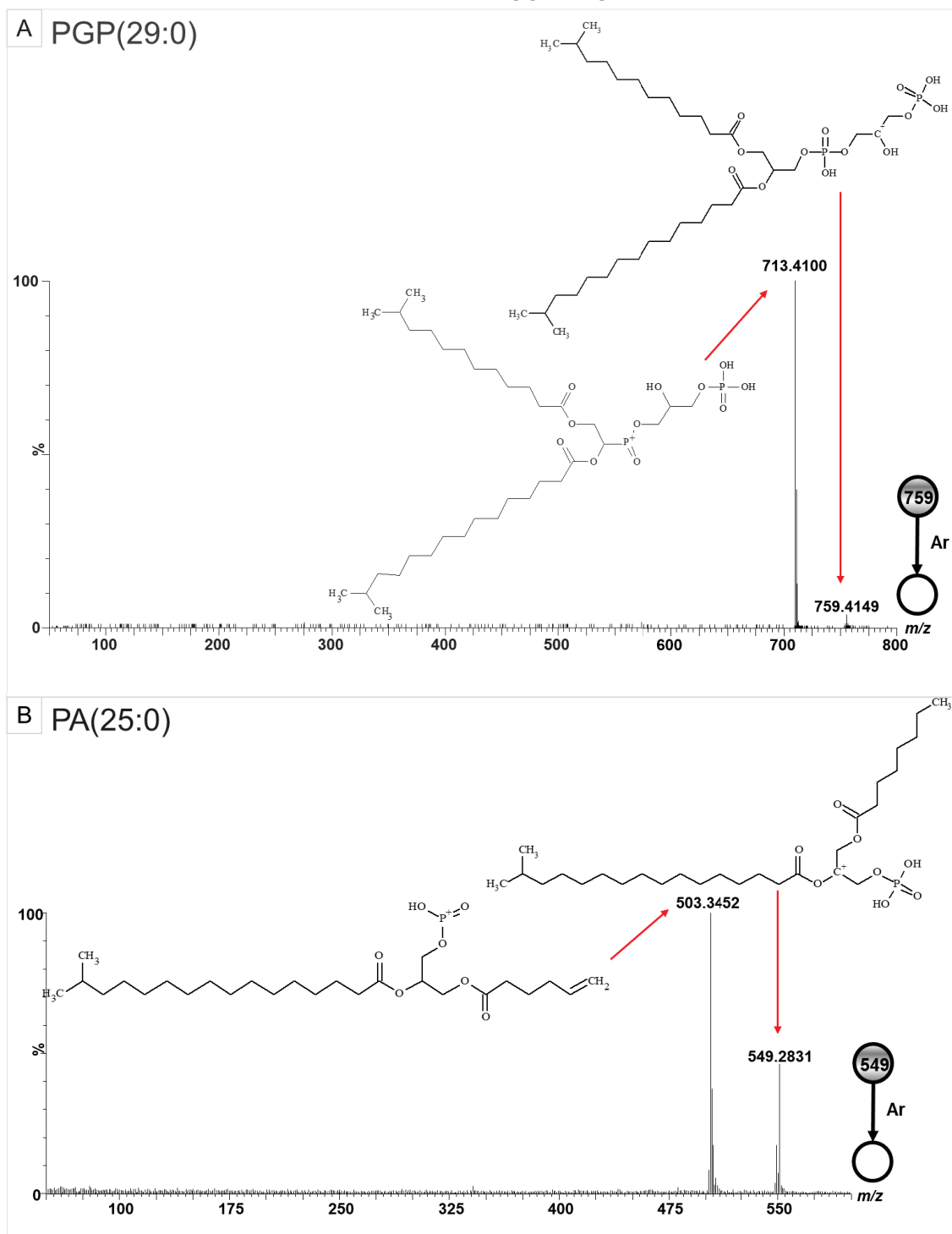
TABELA 9 – METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR LC-MS/MS NAS LAGARTAS SOBREVIVENTES A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons).

RT (min)	Massa/carga (m/z)	Classe	Metabólito	ESI	Cód. HMDB	ID (%)
3.023964	377.1404	PTE	Riboflavina	(+)	HMDB0000244	60%
3.05748	421.1342	CM	3- (1,1-Dimetilalil) escopoletina 7-glucosídeo	(-)	HMDB0032853	85%
3.781152	461.1647	COOX	Verbasoside	(-)	HMDB0039233	79%
4.053384	247.1168	AG	Felamurina	(-)	HMDB0031876	96%
4.080744	300.9984	AG	Malation ácido monocarboxílico	(-)	HMDB0060626	91%
4.886496	537.1804	BZ	Ácido Melitrico A	(-)	HMDB0040681	72%
5.282532	661.3293	LP	Prosapogenina	(-)	HMDB0041131	100%
5.39676	710.4102	GFL	PE(34:5)	(+)	HMDB0009448	68%
5.436432	745.3499	GFL	PGP(28:0)	(-)	HMDB0116521	90%
5.527404	705.3553	GFL	PA(37:6)	(-)	HMDB0114830	95%
5.734656	428.2385	BZ	Diidroxiacidissiminol	(+)	HMDB0040792	86%
5.74902	749.3814	AG	$\beta$ -Casomorfina (1-6)	(-)	HMDB0060168	76%
7.504848	721.3573	LP	Octaprenil difosfato	(-)	HMDB0001094	65%
7.5069	1079.559	LP	Pithecelloside	(-)	HMDB0035356	63%
8.126604	759.3723	GFL	PGP(29:0)	(-)	HMDB0116558	98%
8.482968	549.3418	GFL	PA(25:0)	(-)	HMDB0115690	97%
8.61156	399.1456	BD	N-Desmetildiltiazem	(-)	HMDB0061023	89%
8.820864	755.4501	EST	Tuberósido J	(-)	HMDB0039396	90%
9.029484	611.2974	FL	Cartamidina 6,7-diglucosídeo	(-)	HMDB0040125	100%
9.156708	862.4469	GFL	PE-NMe2(44:12)	(-)	HMDB0114601	92%
9.645084	420.2471	BP	Topotecano	(-)	HMDB0015164	100%
10.511712	765.3593	GFL	PA(42:11)	(-)	HMDB0115418	96%
10.718964	518.2507	GFL	LisoPC(18:2(9Z,12Z)/0:0)	(-)	HMDB0010386	90%
10.874916	663.4106	GFL	PA(34:6)	(-)	HMDB0114803	92%
11.565072	364.2459	AC	Aegle marmelos Alcaloide C	(-)	HMDB0040775	97%
4.797576	665.3016	NI	NI	(-)	NI	NI
5.658048	789.3763	NI	NI	(-)	NI	NI
8.572572	1135.626	NI	NI	(-)	NI	NI
9.156708	1135.627	NI	NI	(-)	NI	NI
11.987784	334.2332	NI	NI	(-)	NI	NI

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: TR: tempo de retenção; Cód. HMDB: Código no *Human Metabolome Database*; ID: Similaridade com o banco de dados; ESI: *electrospray*; GFL: Glicerofosfolipídios; AG: Acil Graxos; LP: Lipídios de Prenol; BZ: Benzeno e derivados; BP: Benzopiranos; FL: Flavonoides; AC: Ácido cinâmico e derivados; EST: Esteroides e derivados; BD: Benzodiazepinas; CM: Cumarinas; COOX: Compostos Organooxigenados; PTE: Pteridinas; NI: Não Identificados.

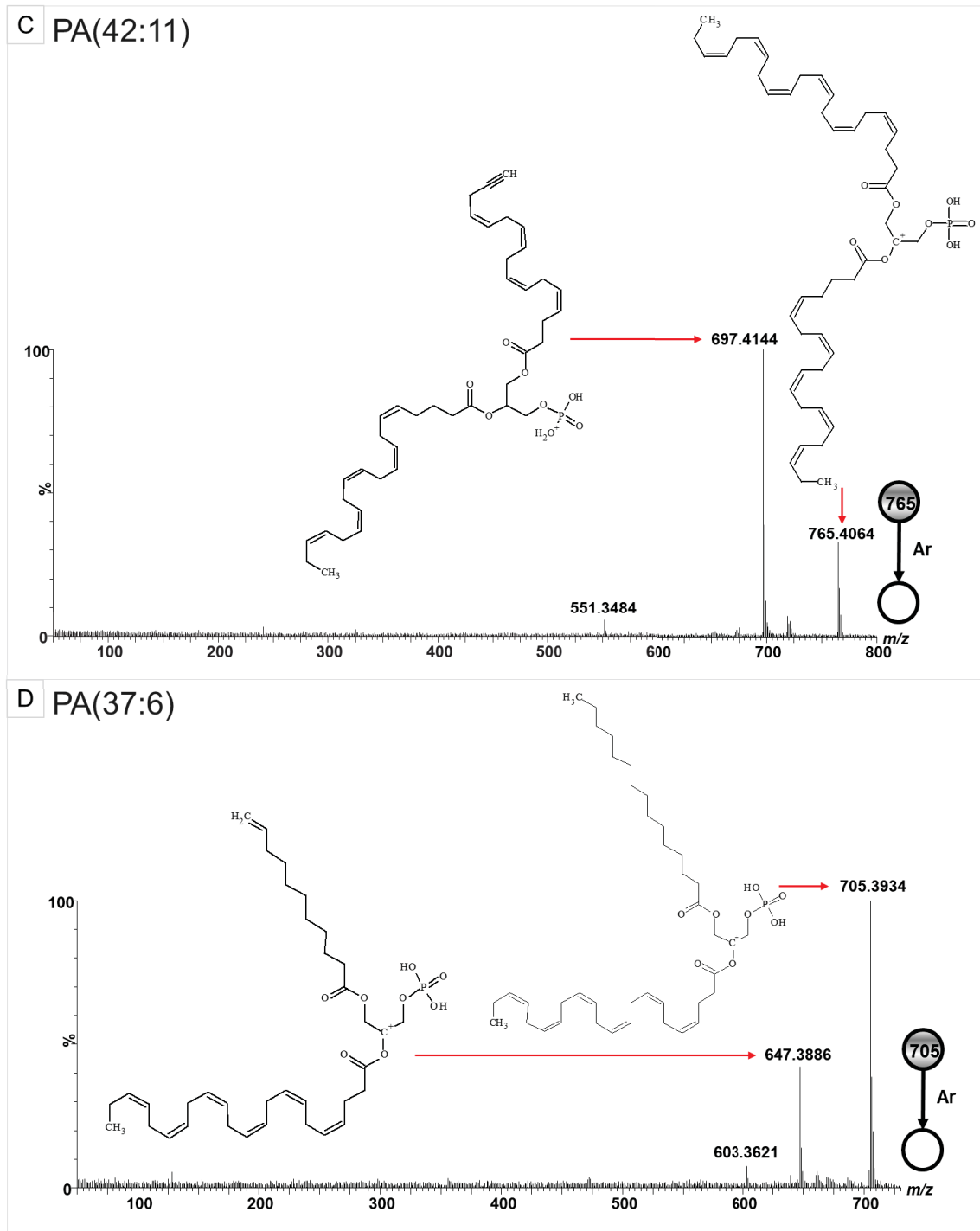
FIGURA 9 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons). CONTINUA.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: A) [M-H]<sup>-</sup> de PGP(29:0) (*m/z* 759) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.  
 B) [M-H]<sup>-</sup> de PA(25:0) (*m/z* 549) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.

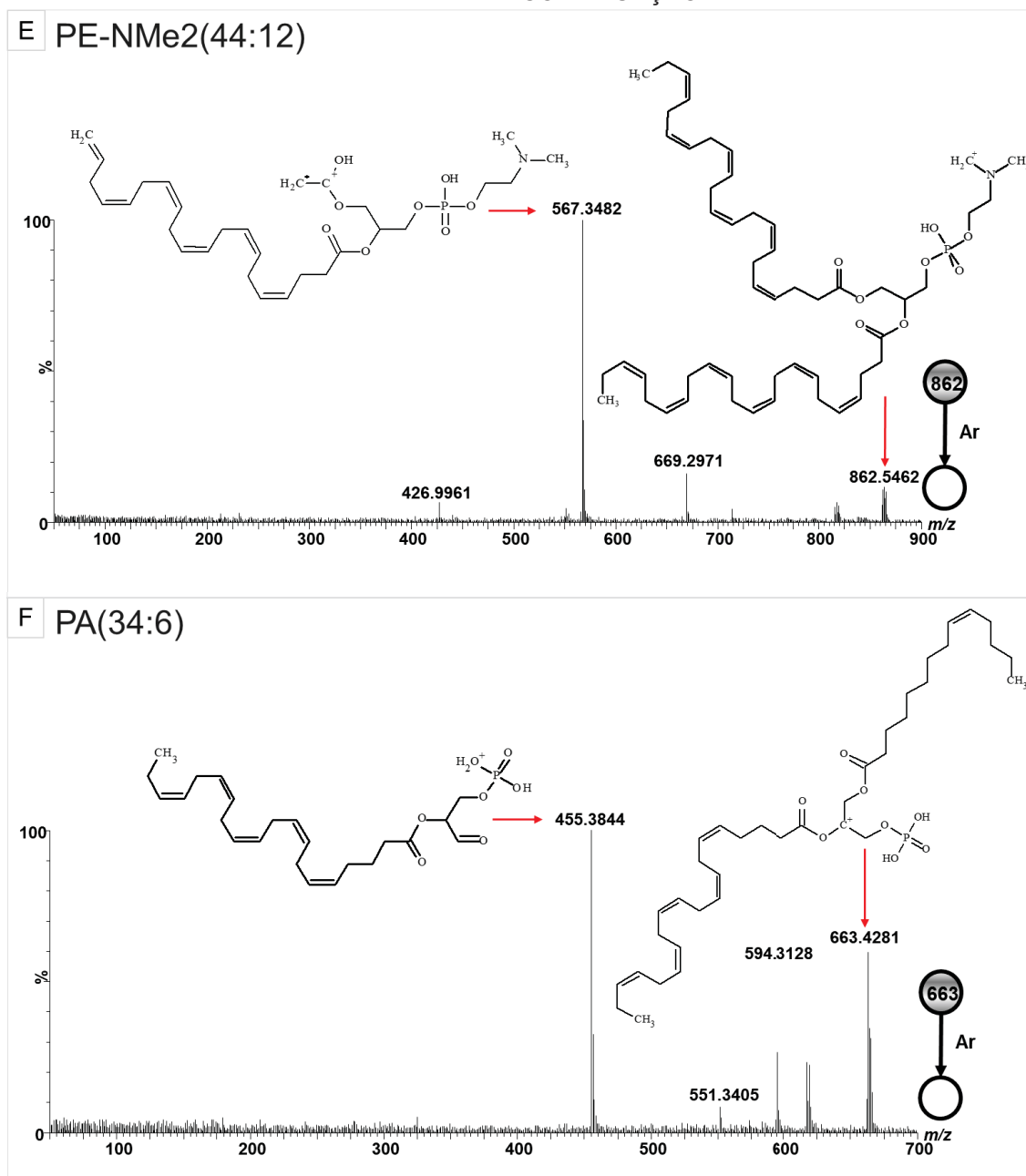
FIGURA 9 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons).  
CONTINUAÇÃO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: C) [M-H]<sup>-</sup> de PA(42:11) (*m/z* 765) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.  
D) [M-H]<sup>-</sup> de PA(37:6) (*m/z* 705) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.

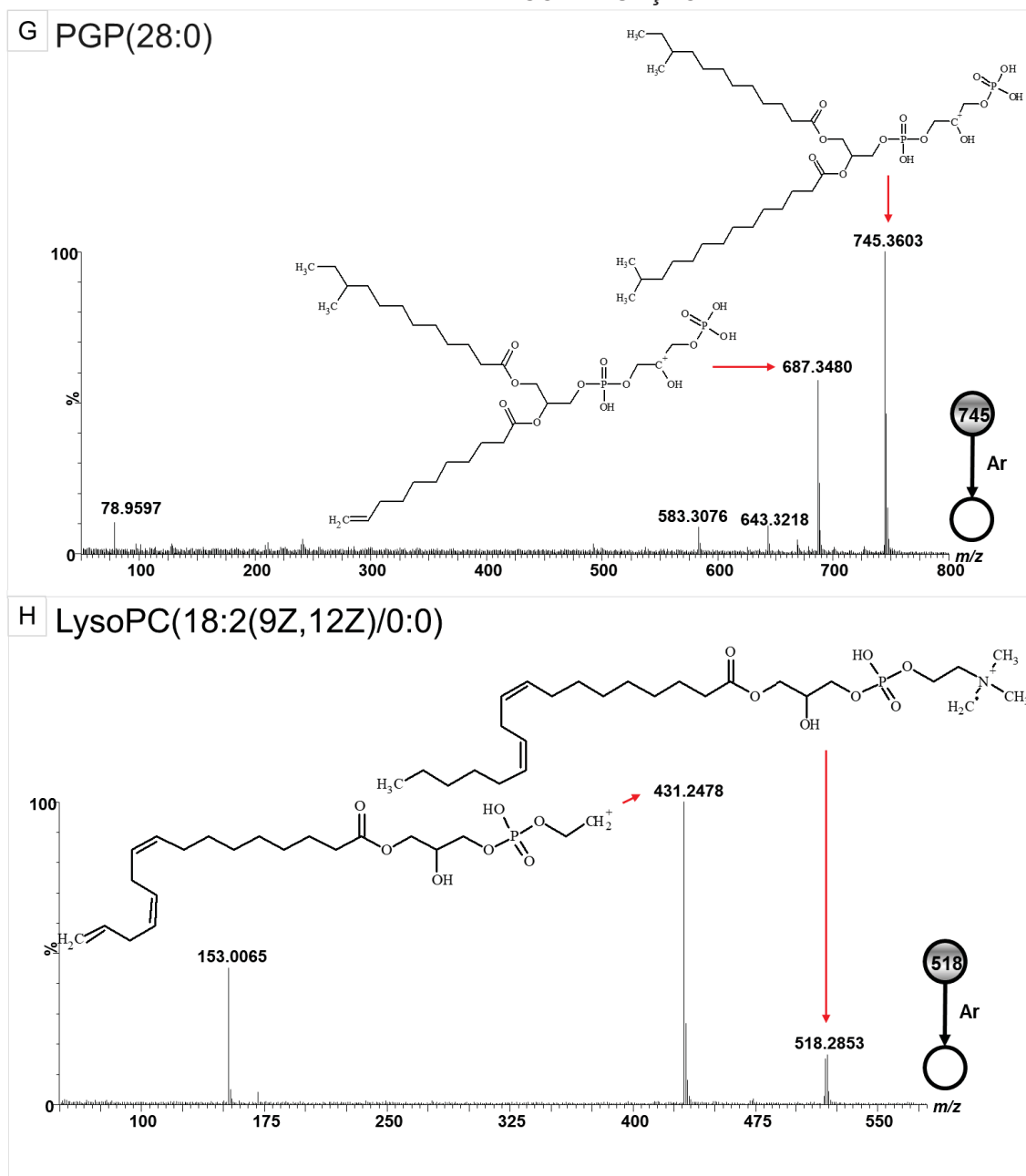
FIGURA 9 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons).  
CONTINUAÇÃO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: E)  $[M-H]^-$  de PE-NMe2(44:12) ( $m/z$  862) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.  
F)  $[M-H]^-$  de PA(34:6) ( $m/z$  663) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.

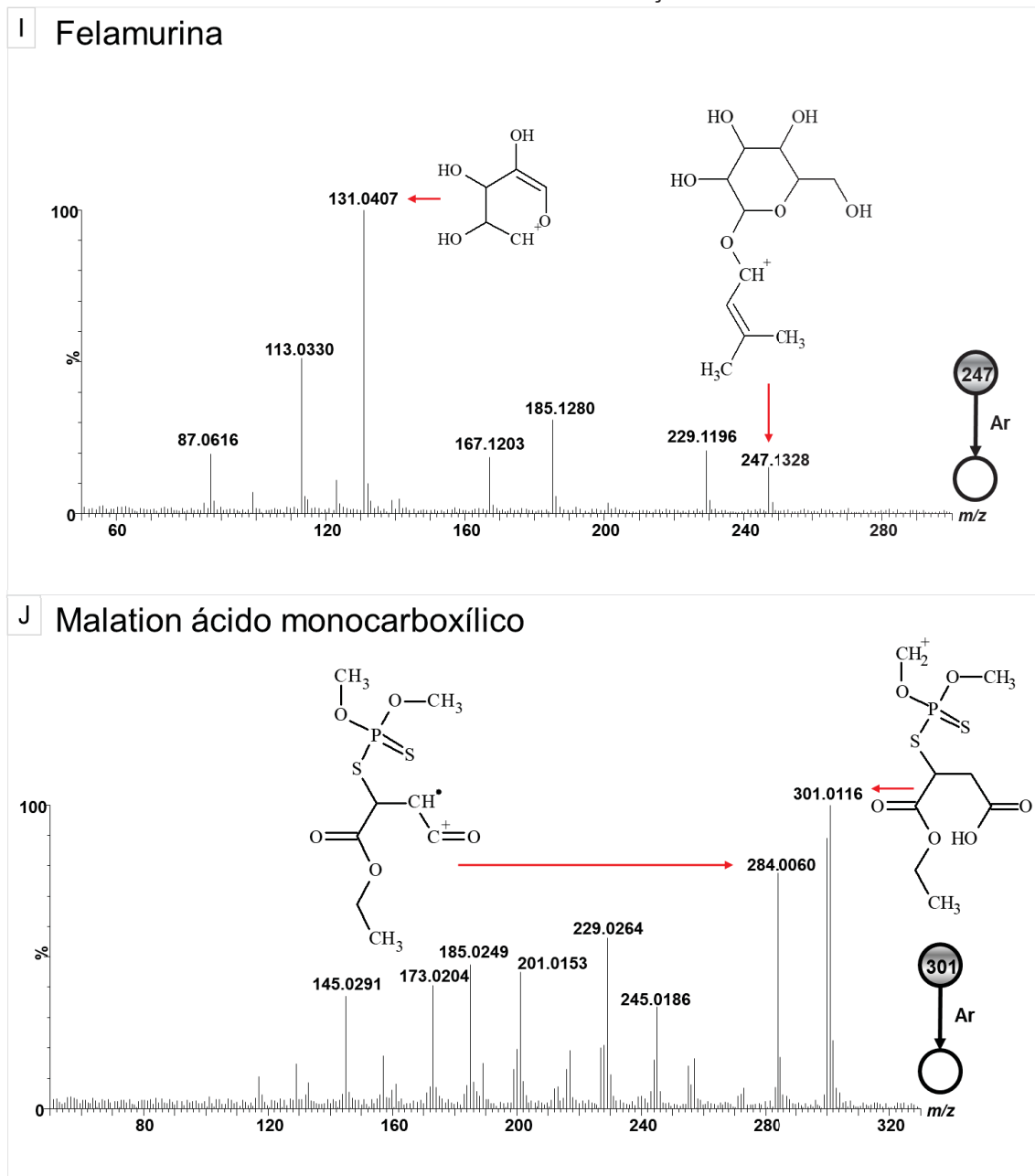
FIGURA 9 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons).  
CONTINUAÇÃO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: G)  $[M-H]^-$  de PGP(28:0) (m/z 745) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.  
H)  $[M-H]^-$  de LysoPC(18:2(9Z,12Z)/0:0) (m/z 518) pertencente a classe dos Glicerofosfolipídios.

FIGURA 9 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons). CONTINUAÇÃO.

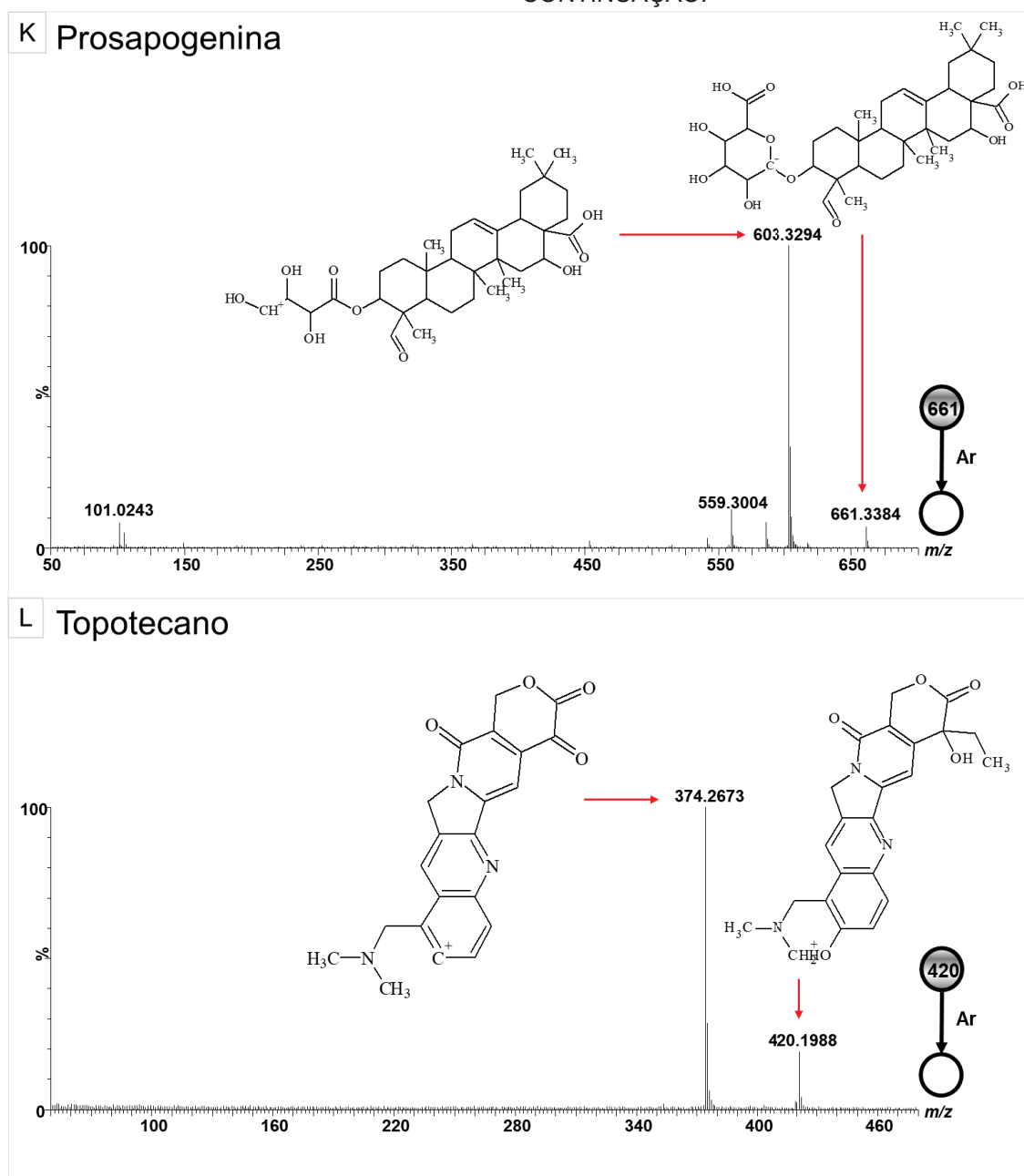


FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: I) [M-H]<sup>-</sup> de Felamurina (*m/z* 247) pertencente a classe dos Acil Graxos.

J) [M-H]<sup>-</sup> de Malation ácido monocarboxílico (*m/z* 300) pertencente a classe dos Acil Graxos.

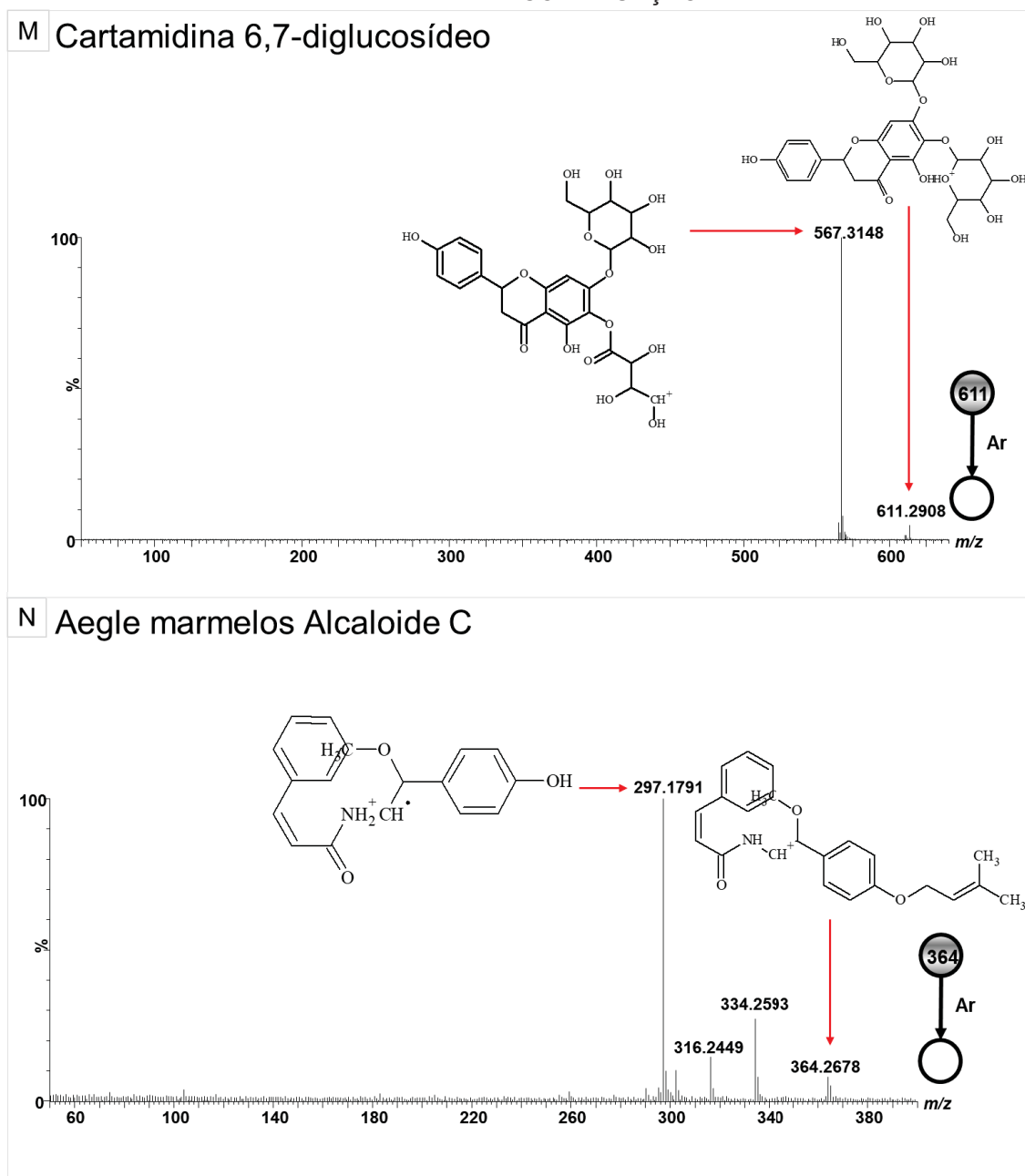
FIGURA 9 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons). CONTINUAÇÃO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: K)  $[M-H]^-$  de Prosapogenina ( $m/z$  661) pertencente a classe dos Lipídios de Prenol.  
L)  $[M-H]^-$  de Topotecano ( $m/z$  420) pertencente a classe dos Benzopiranos.

FIGURA 9 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons).  
CONTINUAÇÃO.



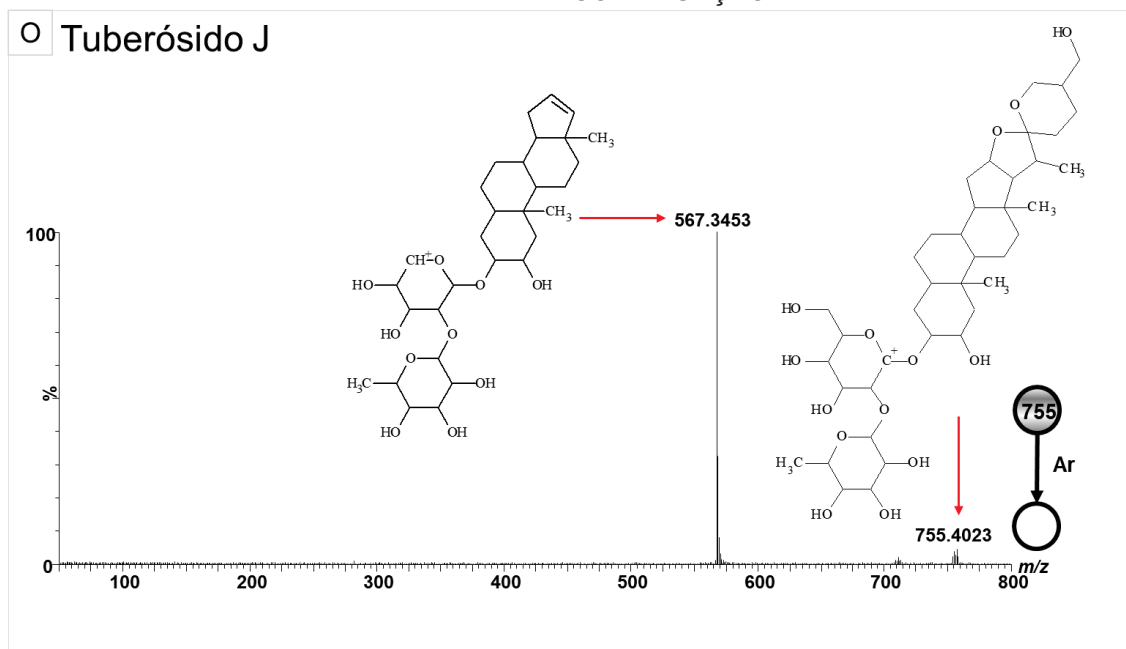
FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: M)  $[M-H]^-$  de Cartamidina 6,7-diglicosídeo ( $m/z$  611) pertencente a classe dos Flavonoides.

N)  $[M-H]^-$  de Aegle marmelos Alcaloide C ( $m/z$  364) pertencente a classe dos Ácidos cinâmicos.



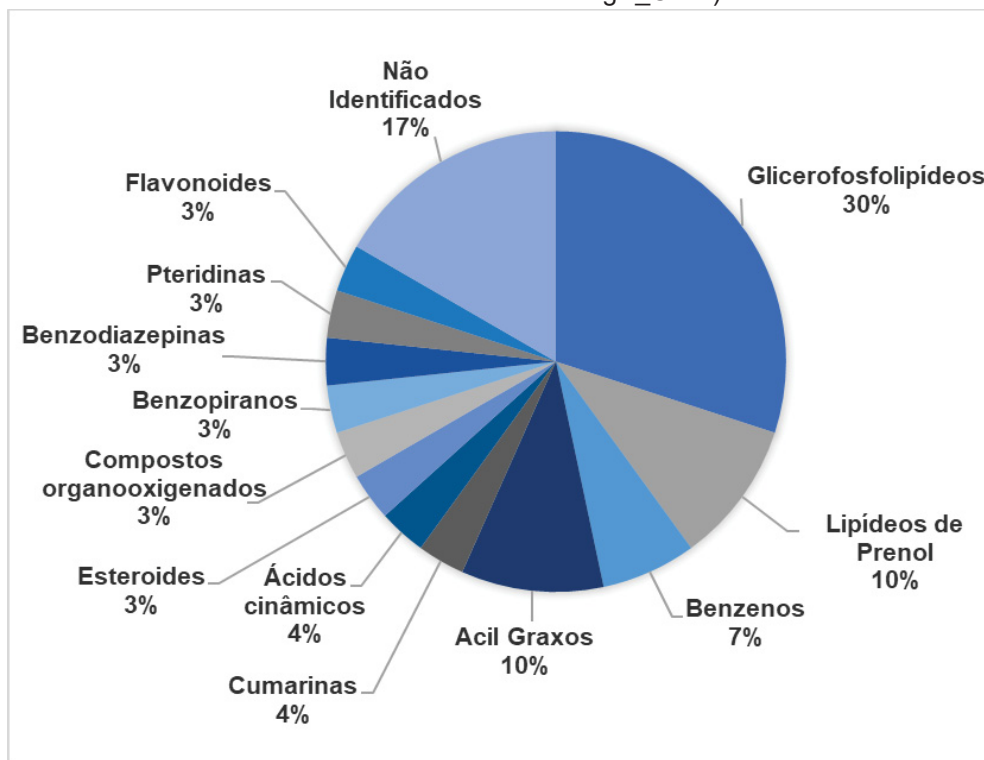
FIGURA 9 – ESPECTROS DE ESI-MS/MS DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS COM SIMILARIDADE ACIMA DE 90% NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons). CONTINUAÇÃO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: O [M-H]<sup>-</sup> de Tuberósido J ( $m/z$  755) pertencente a classe dos Esteroides.

FIGURA 10 – CLASSES DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS NAS LAGARTAS QUE SOBREVIVERAM A INOCULAÇÃO DOS FUNGOS (LagS\_Bov2; LagS\_Bov3 e LagS\_Cons).



FONTE: A autora (2021)

## 4 DISCUSSÃO

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram duas linhagens de *B. bassiana*, quando utilizadas em conjunto, como um consórcio fúngico, tem seu potencial de controle aumentado contra *D. fovealis* (STUART et al., 2020). Apesar disso, algumas lagartas foram capazes de sobreviver a aplicação destes fungos, sugerindo a existência de uma possível resistência. Desta forma, no presente trabalho buscamos entender a interação entre *D. fovealis* x Consórcio, através de metabolômica por GC-MS e LC-MS/MS, de modo a estabelecer uma hipótese para a maior mortalidade observada em LagM\_Cons, bem como avaliar a presença de marcadores que justificassem a sobrevivência.

### 4.1 LAGARTAS MORTAS

Após a realização das análises observamos importante diferença nos metabólitos de LagM\_Cons frente às lagartas que receberam a aplicação dos fungos isoladamente (LagM\_Bov2 e LagM\_Bov3) (FIGURA 2). Em LagM\_Cons foram identificadas 15 classes de metabólitos, sendo os glicerofosfolipídios (GFL) a mais representativa, com 38% do total de metabólitos (FIGURA 8). GFLs estão envolvidos em inúmeros processos que vão desde a regulação da permeabilidade da membrana até a sinalização celular podendo servir de fonte para a produção de outros metabólitos. Além disso, são importante fonte de energia metabólica e são os principais constituintes de membrana celular (KERWIN, TUININGA e ERICSSON, 1994). Os metabólitos identificados como LPA (ácido lisofosfatídico), PA (ácido fosfatídico), PS (fosfatidilserina), LPS (Lisofosfatidil serina), LPE (Lisofosfatidil etanolamina) e PE (fosfatidil etanolamina) (TABELA 8) por exemplo, são pertencentes à essa classe. O metabólito Alkyl-DHAP atua como intermediário na síntese destes fosfolipídios (HMDB).

Fungos e leveduras são capazes de reorganizar e mudar a composição lipídica da membrana celular para regular a permeabilidade de moléculas oxidantes e prevenir seus danos (FOLMER et al., 2008). A produção de estresse oxidativo, mediado por moléculas oxidativas como espécies reativas de oxigênio (ROS) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), é o primeiro mecanismo de defesa de insetos frente a infecções fúngicas (AZEVEDO et al., 2014), desta forma, para se proteger, os fungos

passam a hidrolisar GFLs, liberando glicerol, que o ajudará a penetrar na cutícula do inseto (WANG e ST. LEGER, 2007). Os ácidos graxos provenientes da hidrólise dos GFLs sofrem reações de oxidação espontânea, formando oxilipinas que, além de atuar como molécula sinalizadora estimulando o crescimento, esporulação e patogenicidade do fungo, evitam que ROS ataquem moléculas importantes como o DNA e proteínas (TSITSIGIANNIS e KELLER, 2007; CHRISTENSEN e KOLOMIETS, 2011; TRIENENS e ROHLFS, 2012; LUO et al., 2015). Além disso, por atuarem como moléculas sinalizadoras, estas oxilipinas podem ativar genes como poliketídeo sintases (PKS) e peptídeos não ribossomais sintases (NRPS), para a produção de metabólitos tóxicos (CHRISTENSEN e KOLOMIETS, 2011; ZHANG et al., 2016).

Metabólitos como ornitina e 19'-Hexanoiloximtiloxantina (19'-H), identificados em LagM\_Cons, também possuem atividade antioxidante. Ornitina é um metabólito precursor das poliaminas putrescina, espermina e espermidina, que atuam juntamente no desenvolvimento, esporulação e germinação fúngicos (SINGH, MUKERJEE e RAJAM, 2020). Estas poliaminas são moléculas altamente antioxidantes (VALDÉS-SANTIAGO e RUIZ-HERRERA, 2014; PATIL, SARRAT e KHARKWALL, 2020). Diversos estudos vêm demonstrando que o silenciamento de genes envolvidos na conversão de ornitina em poliaminas, afeta diretamente a resistência fúngica ao estresse oxidativo, bem como reduz sua virulência (SANNAZZARO et al., 2003; HISSSEN et al., 2005; PULIDO et al., 2011; WU et al., 2017; SINGH, MUKERJEE e RAJAM, 2020). Pulido et al. (2011) demonstraram que o gene ODC1, relacionado ao processo de conversão de *ornitina* em putrescina, tem sua expressão significativamente aumentada em *Metharhizium anisopliae* durante a infecção em seu inseto alvo *Plutela xylostela*, principalmente na etapa final de infecção/morte do inseto, sugerindo que estes metabólitos são essenciais para a ação entomopatogênica.

19'-Hexanoiloximtiloxantina, por sua vez, é um carotenoide (MAOKA et al., 2011; BORODINA, 2013), pigmento cuja principal função é a proteção de células e tecidos contra processos oxidativos (STAHL e SIES, 2003). Estes pigmentos já foram descritos em fungos entomopatogênicos, atuando na detoxificação ambiental causada pela presença de moléculas oxidativas nos tecidos de insetos, durante a colonização fúngica (LUQUE et al., 2012; AZEVEDO et al., 2014; ZHANG et al., 2016). 19'-H é derivado da xantina, metabólito encontrado neste consórcio cultivado *in vitro* (STUART et al., 2021, ITEM 5.1, PÁG 90). Metabólitos como o descrito acima estão correlacionados com a presença de Geranilgeranil difosfato (GGPP) em LagM\_Cons,

o qual atua como precursor na síntese de carotenoides e giberelinas. Além disso, em fungos filamentosos GGPP desempenha papel essencial na sobrevivência celular através participação na respiração celular e na biossíntese de polissacarídeos (MENDE, HOMANN e TUDZYNSKI, 1997; SINGKARAVANIT et al., 2010a e b). Singkaravanit e colaboradores (2010b) descreveram o gene *ggs2* participante da síntese de GGPP em *Metarhizium anisopliae*, que está diretamente relacionado à sua patogenicidade, uma vez que linhagens *knock out* tiveram sua virulência consideravelmente reduzida contra o inseto *Carposina sasakii*. O estudo correlacionou o gene à produção do metabólito secundário ácido helvético, principal agente de virulência da linhagem estudada e que também foi drasticamente reduzido nas linhagens mutantes. O grupo encontrou o mesmo gene (*ggs2*) em *B. bassiana* (SINGKARAVANIT et al., 2010a) e apesar de esta espécie não ter sido o foco do estudo, este resultado demonstra que GGPP pode estar relacionado à produção de metabólitos secundários de virulência no consórcio, uma vez que este é formado por duas linhagens de *B. bassiana*. Além disso, a produção de metabólitos com ação antioxidante corrobora com dados prévios obtidos por este grupo (STUART et al., 2021, ITEM 5.1, PÁG 90).

Por ser uma giberelina, o Juvocimeno 2 encontrado em LagM\_Cons, também está relacionada à GGPP. Juvocimeno 2 é um análogo de hormônio juvenil (HJ) de insetos descrito em manjerição por Bowers (1997) e que atua no sistema de defesa da planta contra insetos. O HJ atua em diversas fases do seu desenvolvimento, em todas as suas mudas até a sua transformação em adultos. Entretanto Williams (1956) observou que, embora o HJ esteja presente durante ambas as fases imatura e adulta do inseto, ele precisa estar ausente durante o crítico período de metamorfose, quando o inseto imaturo muda para a forma adulta. Durante a metamorfose os tecidos e órgãos do inseto são reorganizados e esta mudança só ocorre na ausência total de HJs. Desta forma, a exposição ao HJ exógeno em insetos em fase de metamorfose, provocou alterações morfogenéticas, tornando-os incapazes de completar seu desenvolvimento e provocando morte precoce. Frente a esta descoberta, análogos de HJs passaram a ser isolados de diversas plantas e sintetizados visando o controle de insetos. No caso de J2, sua analogia funcional à HJs foi demonstrada em *Oncopeltus fasciatus* (NISHIDA, BOWERS e EVANS, 1984). Desta forma, a produção de um análogo de HJ pelo consórcio pode elevar sua virulência através da possível inibição da etapa de metamorfose em *D. fovealis*.

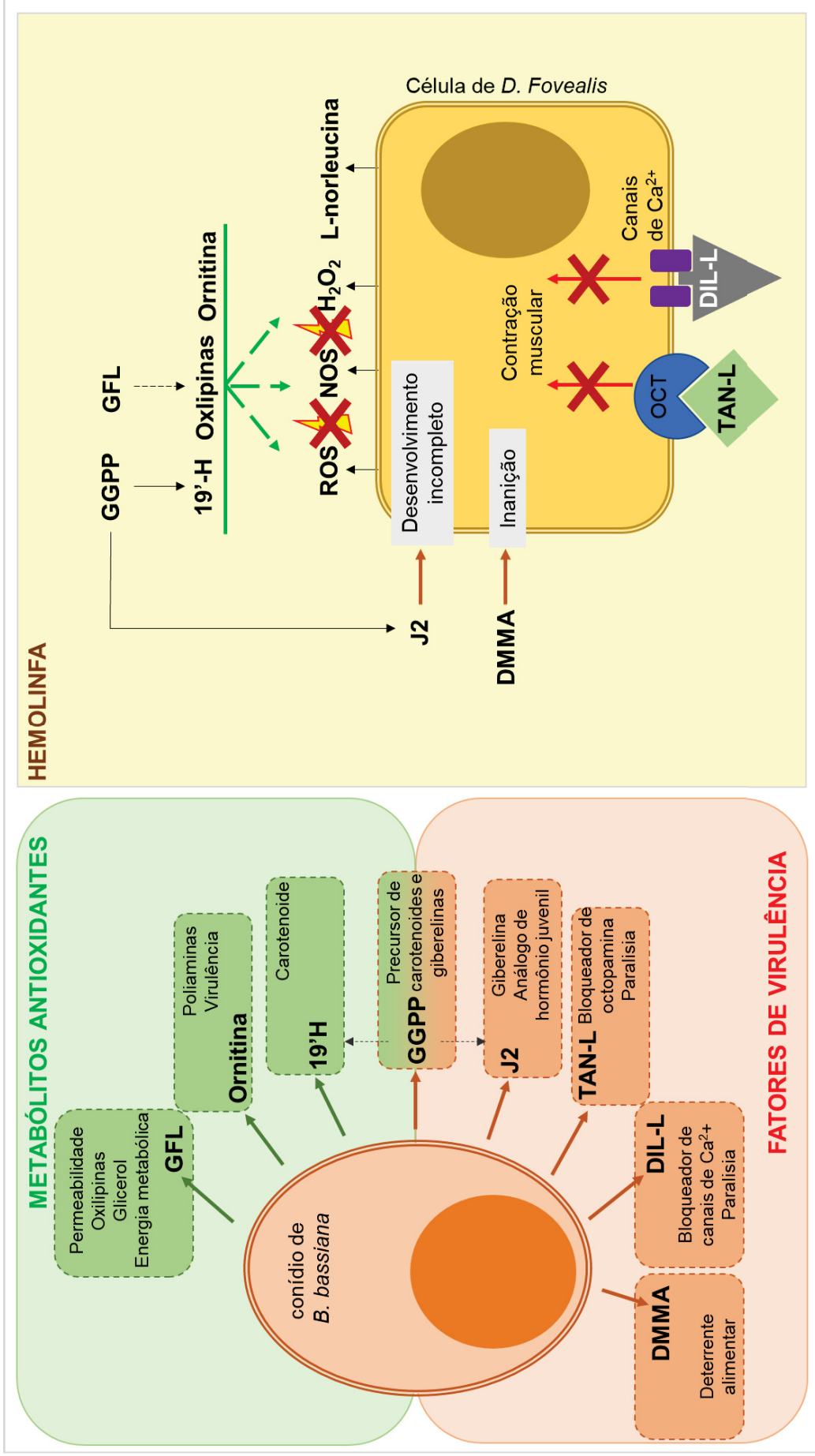
Dois metabólitos, Diltiazem e a Tansulosina, foram identificados como fármacos no HMDB. Diltiazem é um bloqueador dos canais de cálcio que atua relaxando a musculatura lisa (CHAFFMAN e BROGDEN, 1985). Alguns metabólitos produzidos por fungos entomopatogênicos são amplamente conhecidos por atuar diretamente nos canais de cálcio, como as destruxinas. Estas proteínas atuam nos receptores causando despolarização da membrana, que implica em paralisia e morte do inseto, além de provocar diversas alterações na sinalização celular e resposta imune do inseto dificultando a encapsulação e fagocitose do patógeno (PAL, ST LEGER e WU, 2007). A tansulosina, por sua vez, é um antagonista dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e atua bloqueando estes receptores e causando, assim como o diltiazem, o relaxamento do músculo liso (DUNN, MATHESON e FAULDS, 2002). Os receptores de octopamina, são receptores de animais invertebrados, análogos aos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos dos vertebrados que, teoricamente, podem ser ativados/bloqueados pelas mesmas moléculas (LIND et al., 2010). Desta forma, medicamentos como a tansulosina, seriam capazes de “bloquear” estes receptores e causar efeitos similares em insetos. Embora o diltiazem já tenha sido descrito como produto da ação de lipases microbianas em síntese biotecnológica (MATSUMAE, FURUI e SHIBATANI, 1993) e esse processo tenha se mostrado mais eficaz do que o processo químico empregado na síntese deste medicamento, ambas moléculas acima citadas (diltiazem e tansulosina) são moléculas sintéticas, que não foram, até onde sabemos, descritas como produtos biológicos do metabolismo de organismos vivos. Por este motivo, apesar de estas moléculas terem apresentado similaridade  $\geq 90\%$  no banco de dados, nós identificamo-las como Diltiazem-like e Tansulosina -like, uma vez que são moléculas muito similares e possivelmente com a mesma ação biológica. Estes metabólitos produzidos pelo consórcio, podem estar exercendo ação paralisante em *D. fovealis*, visto que ambas as moléculas atuam no relaxamento da musculatura lisa, o que acaba reduzindo a locomoção do inseto, dificultando sua alimentação e causando por fim sua morte.

Por fim, o metabólito de LagM\_Cons ácido 2,5-Dimetoximandélico, derivado de ácido mandélico, possivelmente atua na mortalidade de *D. fovealis* através da ação deterrente alimentar, uma vez que sua molécula precursora ácido mandélico é amplamente conhecido por sua ação deterrente e repelente de insetos (BARTHEL, LEON e HALL, 1953; BLOSZYK et al., 1990).

Em contrapartida a todos esses metabólitos que parecem estar “atacando as lagartas”, o metabólito L-norleucina parece estar relacionado à defesa da mesma. L-norleucina é um aminoácido análogo à metionina, que por sua vez é uma molécula altamente antioxidante (LEVINE et al., 1996; ZOU et al., 2018). Esta atividade da metionina está associada a presença de enxofre em sua molécula, que reagem com as moléculas oxidantes formando metionina sulfóxido, protegendo o sítio ativo das proteínas e demais moléculas do estresse oxidativo. Por ser uma molécula análoga, L-norleucina substitui os resíduos de metionina nas proteínas, entretanto ela não possui átomos de enxofre, em seu lugar há grupos metileno (CH<sub>2</sub>), os quais não possuem capacidade antioxidante (LOU e LEVINE, 2009). Desta forma, ao produzir L-norleucina, teoricamente a quantidade de moléculas antioxidantes no meio seriam reduzidas, deixando o consórcio mais suscetível aos danos causados pelo estresse oxidativo produzido pelo sistema imune de *D. fovealis*. Entretanto, como demonstrado ao longo desta discussão, diversas outras moléculas antioxidantes estão sendo produzidas, atuando afinal na proteção do consórcio.

Observamos que diversas moléculas encontradas neste trabalho parecem estar envolvidas com o aumento da patogenicidade dos fungos, quando em consórcio. Os metabólitos identificados foram divididos em duas funções primárias: antioxidantes e fatores de virulência (FIGURA 11). Entre os metabólitos identificados como antioxidantes estão a ornitina, que é precursor de poliaminas e, além de atuarem como antioxidantes, tem papel essencial na virulência fúngica. O carotenoide 19'H, que possui alto potencial antioxidante e está diretamente relacionado à presença de GGPP. E os GFLs, que dão origem às oxilipinas, as quais atuam prevenindo o estresse oxidativo, bem como ativam genes para produção de metabólitos secundários. Esses GFLs, são também fonte de energia metabólica e atuam na multiplicação celular e germinação de conídios, fator essencial para penetração dos fungos nos insetos. Daqueles que foram considerados fatores de virulência, o metabólito Juvocimeno 2, que é também derivado de GGPP, atua como análogo do hormônio juvenil de insetos, provocando malformações e morte. tansulisina-like e diltiazem-like, são bloqueadores dos receptores da octopamina e canais de Ca<sup>2+</sup> respectivamente, e causam paralisia da musculatura lisa do inseto, provocando sua morte e o metabólito ácido 2,5-Dimetoximandelico, que possui ação deterrente alimentar, que pode levar à morte por inanição, e repelente.

FIGURA 11 – PROPOSIÇÃO DA ATUAÇÃO DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS EM LAGM\_CONS EM *Duponcheila fovealis*.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: GFL: Glicerofosfolípidios; 19'H: 19'-Hexanoiloximiltoxantina; GGPP: geranylgeranyl difosfato; J2: Juvocimeno 2; TAN-L: tansulosina-like; DIL-L: diltiazem-like; DMMA: ácido 2,5-Dimetoximandelico; OCT: receptores da octopamina.

Desta forma, a hipótese que surge após análise de tais metabólitos é de que o aumento na mortalidade de *D. fovealis* está relacionado a produção de metabólitos antioxidantes, que irão combater o estresse oxidativo causado pelo inseto, bem como de metabólitos indutores de virulência fúngica.

#### 4.2 LAGARTAS SOBREVIVENTES

Para traçar o perfil metabólico foram avaliadas lagartas que receberam suspensões de conídios de *B. bassiana* e sobreviveram após sete dias de inoculação, utilizando como controle lagartas que receberam apenas solução salina. Foram identificados então diversos biomarcadores que diferenciam as lagartas controle (LagS) das lagartas que receberam as suspensões fúngicas (LagS\_Bov3, LagS\_Bov2 e LagS\_Cons).

Assim como em LagM\_Cons, a classe mais representativa identificada nas lagartas sobreviventes foi a dos glicerofosfolipídios (GFL) (31% - FIGURA 10). Em insetos os fosfolipídios mais abundantes são as fosfatidiletanolaminas (PE) e fosfatidilcolinas (PC), entretanto sua proporção varia entre espécies e estado fisiológico. Essas moléculas possuem imensa importância no desenvolvimento de insetos, participando como substrato para a embriogênese, a metamorfose, voo, como constituinte de hormônios de crescimento e feromônios, por exemplo (GALLON et al., 2019). No presente trabalho identificamos as moléculas PA, PGP, PE e LysoPC com similaridade acima de 90% (TABELA 9).

Após avaliação metabólica de LagS\_Bov3, LagS\_Bov2 e LagS\_Cons cinco moléculas chamaram atenção por estarem aparentemente relacionadas à defesa de *D. fovealis* contra os fungos, são elas: N-alfa-Acetil-L-Lisina, 2-Palmitoilglicerol, Uridina, *Aegle marmelos* Alcaloide C (AMA-C) e D-Eritrotetrafuranose (TABELA 4).

A presença de N-alfa-Acetil-L-Lisina ou acetilação dos resíduos de lisina (Kac), nas proteínas, exerce diversas funções celulares, principalmente na transcrição gênica pela acetilação/desacetilação das histonas. Em insetos, Kac possui também um importante papel sobre a proteína de armazenamento SP2 na hemolinfa, responsável pelo controle da apoptose (YU et al., 2013). ZHOU et al. (2016) demonstraram que as SPs são proteínas altamente acetiladas (por possuírem diversos Kac) e a indução de Kac pode aumentar a sobrevivência celular em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através do aumento na transcrição de SP2, que possui atividade anti-



apoptótica. Desta forma, como a primeira linha de defesa de insetos é produzir moléculas oxidativas, na presença de um patógeno, Kac estaria elevando os níveis de SP2 e conseqüentemente “protegendo” as células da apoptose induzida pelo estresse oxidativo.

O 2-Palmitoilglicerol é derivada do ácido palmítico, ácido graxo amplamente conhecido por estimular a resposta inflamatória. O ácido palmítico é capaz de estimular células do sistema imune através de sua ligação com os receptores Toll-like 4 (TLR4), que induz a cascata de NF- $\kappa$ B e a produção de ROS, desencadeando uma resposta pró-inflamatória aguda, em humanos (SCHAEFLER et al., 2009; SHIRASUNA et al., 2016; NICHOLAS et al., 2017). Conforme citado anteriormente, a resposta inflamatória, juntamente com o estresse oxidativo, compõe a primeira linha de defesa do sistema imune dos insetos. Dessa forma, a produção de moléculas pró-inflamatórias atua diretamente na defesa contra patógenos, como no caso de *B. bassiana*.

AMA-C, por sua vez é um alcaloide inicialmente isolado da planta *Aegle marmelos*, também conhecida como Bael. Bael é amplamente utilizada como tratamento para inúmeras doenças, incluindo algumas micoses, e um dos seus principais constituintes bioativos são os alcaloides (JATAV et al., 2018). Estudos farmacológicos utilizando extratos de Bael demonstram potente atividade fungicida contra fungos patogênicos à humanos, como *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum* (BALAKUMAR et al., 2011), *C. albicans* (GUPTA, THOMAS e KHAN, 2018), e contra os fungos fitopatogênicos *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium oxisporum* (TIMBADIYA, MANDAVIA e GOLAKIYA, 2018). A produção de alcaloides em insetos é constitutiva e tem funções importantes, atuando como feromônios atrativos e repelentes, comunicação, pigmentos e como defensivos, no caso de sinalização de perigo, bem como a produção de metabólitos tóxicos e venenos (NUMATA e IBUKA, 1987; HARTMANN et al., 1990). O metabólito D-Eritrotetrofuranose, por ser derivado da eritrose, pode estar relacionado à produção destes alcaloides, pois a eritrose atua na via da glicólise, que está diretamente relacionada à via do shikimato e da pentose fosfato, as quais dão origem aos mais diversos alcaloides (KEGG PATHWAY). A uridina e seus derivados possuem também possuem atividade antifúngica comprovada. Em diversos estudos, derivados acilados de uridina demonstraram atividade fungicida *in vitro* contra *Aspergillus niger*,

*A. flavus* e *Rhizopus nigricans*, por exemplo (KAWSAR et al., 2018; DEVI et al., 2019; MAOWA et al., 2021). Desta forma, por AMA-C ser proveniente de uma planta altamente fungicida e a produção de alcaloides em insetos estar diretamente relacionada à sua defesa, e derivados de uridina possuem atividade fungicida, a presença destes metabólitos aparentemente está relacionada à defesa de *D. fovealis* contra as diferentes linhagens de *B. bassiana*. Via de regra, cada inseto produz um conjunto único de peptídeos antimicrobianos com diferentes estruturas e que tem como alvo diferentes patógenos, além disso, a presença simultânea de diferentes peptídeos torna o inseto ainda mais resistente àqueles patógenos mais danosos (BULET et al., 1999). Além de serem capazes de produzir estas moléculas antifúngicas por si só, a microbiota simbiote dos insetos também é capaz de produzir moléculas antimicrobianas, capazes de “atacar” os patógenos e proteger seu hospedeiro (ZHANG et al., 2013).

Em contrapartida, alguns metabólitos detectados nas lagartas que foram inoculadas com os fungos parecem estar sendo produzidos contra elas. Dentre eles estão Felamurina e Topotecano. O topotecano é uma droga sintética análoga à camptotecina (CP), composto natural isolado pela primeira vez de *Camptotheca acuminata* (ORMROD e SPENCER, 1999). Este composto é um alcaloide e sua produção já foi descrita em diversas espécies de fungos como *Trichoderma atroviride* (PU et al., 2013), *Entrophospora infrequens* (PURI et al., 2005; AMNA et al., 2006) e *Neurospora* sp. (REHMAN et al., 2008). CP é conhecido por suas ações antineoplásica e inseticida. Em 2010, MA e colaboradores estudaram a ação de CP, em casa de vegetação e campo, contra três diferentes insetos pragas: *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) e *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), e verificaram que, mesmo em baixas concentrações, CP foi capaz de causar mortalidade nas três espécies com 94.6%, 69.1% e 85.8%, respectivamente. Liu e colaboradores (2011) e Yang e colaboradores (2014) testaram o potencial de CP, análogos e derivados contra *Brontispa longissima* (Coleoptera: Chrysomelidae) e ambos chamaram atenção para uma importante característica comum dos diferentes compostos testados: atividade inseticida tardia. Os dois estudos avaliaram a mortalidade dos insetos aos 3, 6 e 9 dias após a inoculação dos compostos e verificaram que todas as moléculas testadas apresentaram o mesmo padrão de mortalidade tardia, sendo que o aumento significativo da mortalidade ocorreu principalmente após o 6º até o 9º dia após a

inoculação dos compostos, indo de 0% e 26% à 36% e 63% de mortalidade, respectivamente (YANG et al., 2014). Em um dos casos a mortalidade foi de 42% no 6º dia, para 74% no 9º dia, demonstrando a importância da análise em tempos mais longos de experimento (LIU et al., 2011). Ademais, ambos os trabalhos relatam que este padrão de mortalidade tardia é uma propriedade comum de CP e análogos/derivados, podendo então o topotecano atuar dessa forma em *D. fovealis*.

O metabólito felamurina, por seu lado, é comumente encontrado na planta *Phellodendron amurense* e vem chamando atenção devido à sua capacidade citotóxica contra células de osteosarcoma (ZHANG et al., 2019). O grupo de Zhang constatou a atividade antitumoral de felamurina ocorre pela supressão da via PI3K/AKT/mTOR. Esta via regula a maior cascata de sinalização intracelular em células eucarióticas, que desencadeia inúmeros processos biológicos indispensáveis como proliferação e migração celular (YAP et al., 2008). Desta forma, a inibição da via PI3K/AKT/mTOR afeta a proliferação celular e induz à apoptose (ZHANG et al., 2019). Em fungos a supressão de PI3K/AKT/TOR induz apoptose e autofagia, processo ativado sob situações de estresse o qual o fungo utiliza para recuperar seu estado de homeostase, reciclando suas organelas, além disso a autofagia é um pré-requisito para a patogenicidade fúngica (ZHU et al., 2018). A felamurina é um flavonoide e devido a isso ele possui, como uma das suas principais atividades biológicas, ação antioxidante atuando na supressão de ROS e NOS (KUMAR e PANDEY, 2013). Honda e colaboradores (2011) demonstraram também que a felamurina atua como potente deterrente alimentar e inibidor da oviposição da mariposa *Papilio protenor* (Lepidoptera: Papilionidae) apresentando atividade inseticida indireta.

A presença de felamurina e topotecano (análogo de CP) nas lagartas que sobreviveram após sete dias de inoculação dos fungos, corrobora com as potenciais ações deterrente e ovoinibitória da felamurina e de mortalidade tardia de análogos de CP, demonstrando a necessidade de análises longas de mortalidade.

Assim como a felamurina, a Cartamidina 6,7-diglucosídeo pertence à classe dos flavonoides (KUMAR e PANDEY, 2013). Os fungos são importantes fonte de flavonoides e, uma vez que a produção de radicais livres são a primeira linha de defesa de insetos à infecção por fungos, a produção de metabólitos com ação antioxidante por parte destes fungos faz-se justificada.

Além deste, outros metabólitos podem estar envolvidos na defesa de *B. bassiana* frente ao ataque pelo sistema imune de *D. fovealis*, é o caso da saponina

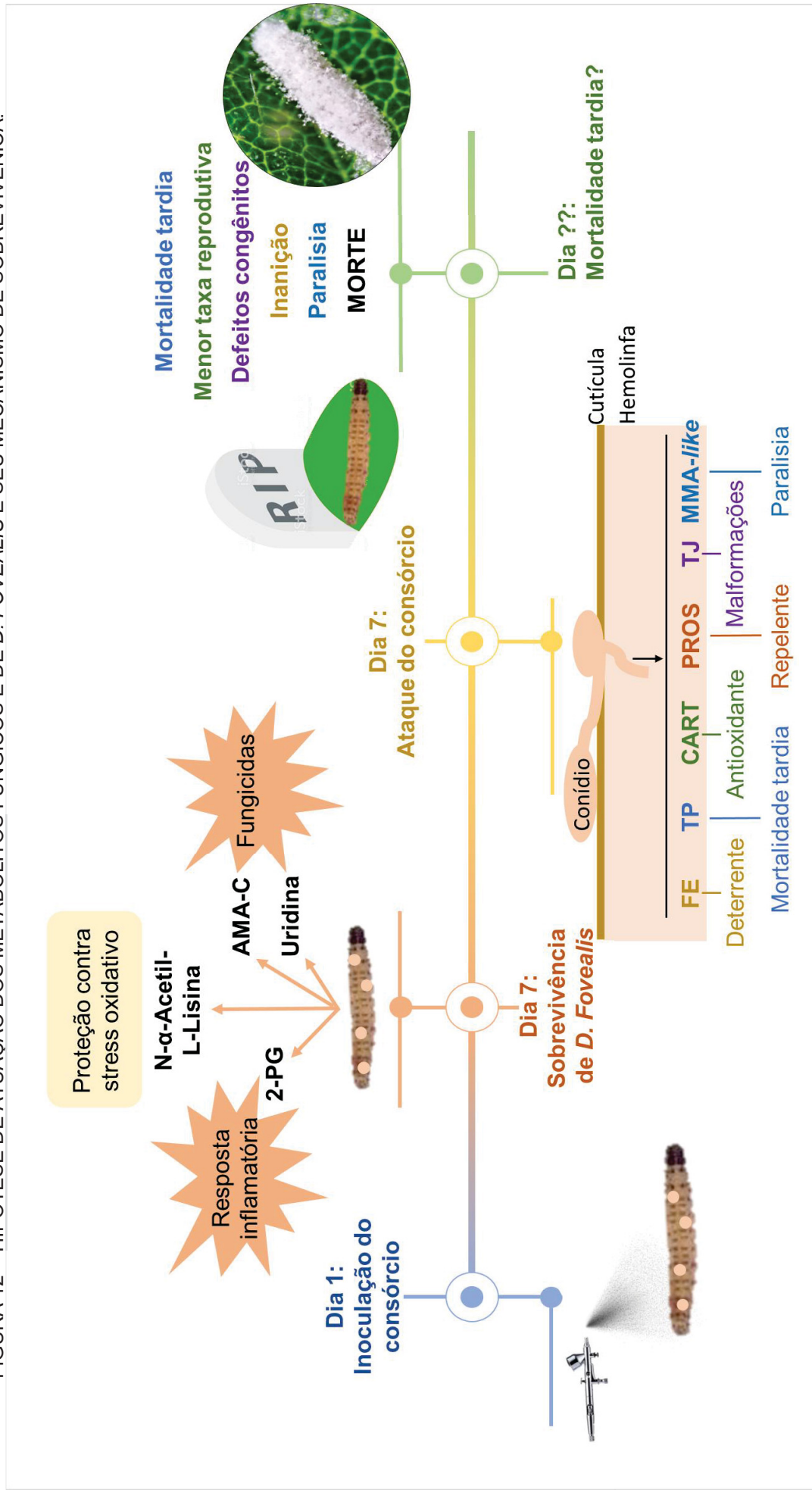
Tuberósido J e da Prosapogenina. Diversas saponinas e pró-sapogeninas – produtos da hidrólise das saponinas – já foram descritas por seu potencial no controle de insetos, entretanto sua ação não ocorre imediatamente do contato. Estas moléculas, em geral, possuem ação repelente, deterrente alimentar e citotóxicas, causando mudas precoces e defeituosas (SAHA et al, 2010). Em uma revisão publicada por Singh e Kaur (2018) os pesquisadores compilaram diversos trabalhos que demonstram os efeitos de saponinas em diferentes lagartas da ordem Lepidoptera e, dentre os numerosos efeitos relatados, além dos já descritos acima, foram observados prolongação do estágio larval e de pupa, diminuição do crescimento, redução da fecundidade e fertilidade em adultos emergentes, redução da digestibilidade, retardo e falha na ecdise, epitélio intestinal danificado, deformações estruturais e citotoxicidade por aumento na permeabilidade celular. Desta forma, a produção de saponinas por parte dos fungos pode estar relacionada à uma mortalidade tardia, afetando sim o inseto e aumentando sua sensibilidade, entretanto atuando de forma indireta, não causando mortalidade imediata, como aparenta ser o caso de outros metabólitos identificados neste trabalho, como PHE e TP.

Foi identificado também a molécula malation ácido monocarboxílico (MMA). Esta molécula é um metabólito do inseticida organofosforado malation, um produto sintético utilizado no combate a pragas agrícolas (HMDB). O metabólito encontrado foi denominado como MMA-like, uma vez que esta molécula é proveniente da síntese química e não há relatos de sua síntese biológica. O malation, assim como os demais metabólitos acima descritos, não causa morte imediata e, por ser um inseticida que atua no sistema nervoso do inseto, impedindo as sinapses nervosas, paralisando-o e induzindo sua morte, acreditamos que MMA-like esteja sendo produzida por *B. bassiana* em ataque à *D. fovealis*.

Dos metabólitos identificados nas lagartas que sobreviveram à inoculação dos fungos, podemos separá-los em dois grupos: o primeiro trata de metabólitos que aparentemente estão sendo produzidos pelas lagartas em resposta ao ataque dos fungos, numa tentativa de sobrevivência. Aqui, identificamos metabólitos como N-alfa-acetil-L-Lisina, que atua na proteção celular contra o estresse oxidativo causado pelo próprio sistema imune da lagarta; o 2-PG, capaz de induzir a resposta inflamatória através da ativação de TLR-4, bem como a produção de moléculas oxidativas; e os metabolitos Uridina e AMA-C, que são altamente antifúngicos e, por fim, o D-Eritrotetrofuranose que parece estar relacionado à produção do alcaloide AMA-C. Os

demais metabólitos identificados nas lagartas sobreviventes aparentam ser produtos do metabolismo fúngico, por possuírem como característica comum a ação inseticida tardia. Dentre eles os metabólitos topotecano, análogo de CP, que possui como característica principal a atividade inseticida tardia, tendo sua taxa de mortalidade elevada a partir do 9º dia; a felamurina, que possui ação deterrente alimentar e ovoidinibitória e, por ser um flavonoide, atua também como antioxidante, da mesma forma que Cartamidina 6,7-diglucosídeo, pertencente a mesma classe; Tuberósido J e Prosapogenina que, além de deterrente alimentar, também possuem atividade repelente e citotóxica, capaz de causar mudas defeituosas e, por fim, o metabólito MMA-like, que por sua semelhança com o inseticida MMA, atua no sistema nervoso do inseto causando paralisia e consequente morte (FIGURA 12).

FIGURA 12 – HIPÓTESE DE ATUAÇÃO DOS METABÓLITOS FÚNGICOS E DE *D. FOVEALIS* E SEU MECANISMO DE SOBREVIVÊNCIA.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: 2PG: 2-Palmitoilglicerol; FE: Felamurina; TP: Topotecano; TP: Topotecano; CART: Cartamidina 6,7-diglicosídeo; PROS: Prosopogenina; TJ: Tuberósido; J; MMA-like: Malation-like

## 5 CONCLUSÃO

Após identificar os metabólitos envolvidos no processo de morte e sobrevivência das lagartas de *D. fovealis*, observamos que os principais mecanismos utilizados pelos fungos em combate às lagartas são: a produção de moléculas antioxidantes, que irão auxiliar no processo de evasão do sistema imune do inseto, bem como de metabólitos que aumentam a virulência fúngica e podem atuar no processo de morte da lagarta de forma indireta - como fatores de crescimento, auxiliando a penetração da cutícula e aumentando sua germinação -, ou exercendo ação direta - provocando malformações nos insetos, atuando como paralisantes e deterrentes alimentares - acarretando sua morte precoce.

Nas lagartas sobreviventes, foi possível observar que o mecanismo de defesa de *D. fovealis* consiste basicamente na ativação do processo inflamatório, produção de moléculas oxidativas e metabólitos com potente ação fungicida. Além disso, foram identificadas moléculas com ação inseticida tardia, que estão atuando na mortalidade da lagarta, entretanto causam a morte do inseto de forma mais lenta. Desta forma, surge uma nova hipótese, de que estes insetos que sobreviveram ao ataque dos fungos em uma avaliação de sete dias, podem estar em processo de morte, abrindo então, espaços para novos estudos visando avaliações mais longas.

## REFERÊNCIAS

AMNA, T.; PURI, S. C.; VERMA, V.; SHARMA, J. P.; KHAJURIA, R. K.; MUSSARAT, J.; SPITELLER, M.; QAZI, G. N. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. **Canadian Journal of Microbiology**, Jammu, v. 52, p. 189-196, 2006.

AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: DE MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Vol. 1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. 69-96.

BALAKUMAR, S.; RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Antifungal activity of *Aegle marmelos* (L.) Correa (Rutaceae) leaf extracts on dermatophytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Tamil Nadu, p. 309-312, 2011.

BARTHEL, W. F.; LEON, J.; HALL, S. A. Insect repellents. I. Esters of mandelic acid and substituted mandelic acids. **The Journal of Organic Chemistry**, Maryland, v. 19, n. 4, p. 485-489, 1954.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Halifax v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BLOSZYK, E.; NAWROT, J.; HARMATHA, J.; DROZDZ, B.; CHMIELEWICZ, Z. Effectiveness of antifeedants of plant origin in protection of packaging materials against storage insects. **Journal of Applied Entomology**, Poznan, v. 110, p. 96-100, 1990.

BOWERS, W. S. Phytochemical defenses targeting the insect endocrine system. **Acta Botanica Gallica**, Tucson, v. 144, n. 4, p. 391-400, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - **Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins** (AGROFIT). Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Consultado em: 15 mai 2021

BRODINA, A. V. **Carotenoids in tissues of the black sea molluscs with different types of nutrition**. 2013. 23 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev.



BUDZINSKI, I. G. F.; MOON, D. H.; MOROSINI, J. S.; LINDÉN, P.; BRAGATTO, J.; MORITZ, T.; LABATE, C. A. Integrated analysis of gene expression from carbon metabolism, proteome and metabolome, reveals altered primary metabolism in *Eucalyptus grandis* bark, in response to seasonal variation. **BMC Plant Biology**, Piracicaba, v. 16, n. 149, p. 1-15, 2016.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.-L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, Strasbourg, v. 23, p. 329-344, 1999.

CHAFFMAN, M.; BROGDEN, R. N. Diltiazem. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, Auckland, v. 29, p. 387-454, 1985.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, Quebec, e86, v. 68, 2019

CHRISTENSEN, S. A.; KOLOMIETS, M. V. The lipid language of plant-fungal interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Texas, v. 48, p. 4-14, 2011.

DESPRÉS, L.; DAVID, J.-P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **TRENDS in Ecology and Evolution**, Grenoble, v. 22, n. 6, p. 298-307, 2007.

DEVI, S. R.; JESMIN, S.; RAHMAN, M.; MACHUR, M. A.; FUJII, Y.; OZEKI, Y.; KAWSAR, S. M. A. Microbial efficacy and two steps synthesis of uridine derivatives with spectral characterization. **Acta Pharmaceutica Scientia**, Chittagong, v. 57, n. 1, 2019.

DUBOVSKIY, I. M.; WHITTEN, M. M. A.; YAROSLAVTSEVA, O. N.; GREIG, C.; KRYUKOV, V. Y.; GRIZANOVA, E. V.; MUKHERJEE, K.; VILCINSKAS, A.; GLUPOV, V. V.; BUTT, T. M. Can insect develop resistance to insect pathogenic fungi? **Plos ONE**, Novosibirsk, v. 8, n. 4, ID. e60248, 2013.

DUNN, C. J.; MATHESON, A.; FAULDS, D. M. Tamsulosin. A review of its pharmacological and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms. **Drugs Aging**, Auckland, v. 19, n. 2, p. 135-161, 2002.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Valencia, v. 47, p. 501-533, 2002.

FOLMER, V.; PEDROSO, N.; MATIAS, A. C.; LOPES, S. C. D. N.; ANTUNES, F.; CYRNE, L.; MARINHO, H. S. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces rapid lipid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Lisboa, v. 1778, p. 1141-1147, 2008.

FRAGA-CORRAL, M.; CARPENA, M.; GARCIA-OLIVEIRA, P.; PEREIRA, A. G.; PRIETO, M. A.; SIMAL-GANDARA, J. Analytical metabolomics and application in health, environmental and food science. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Bragança, p. 1-23, 2020.

GALLON, M. E.; SILVA-JUNIOR, E. A.; AMARAL, J. G.; LOPES, N. P.; GOBBONETO, L. Natural products diversity in plant-insect interaction between *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Chlosyne lacinia* (Nymphalidae). **Molecules**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 17, ID. 3118, 2019.

GONÇALVES, R. B. **Parâmetros biológicos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) em dieta artificial**. 2012, Monografia – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GUPTA, A.; THOMAS, T.; KHAN, S. Physicochemical, Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Aegle marmelos*. **UK Journal of Pharmaceuticals and Biosciences**, Sehore, v. 6, n. 3, p. 17-24, 2018.

HAJEK, A. E.; DELALIBERA JR, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **Biological Control**, Ithaca, v. 55, p. 147-158, 2010.

HARTMANN, T.; BILLER, A.; WITTE, L.; ERNST, L.; BOPPRÉ, M. Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). **Biochemical Systematics and Ecology**, Braunschweig, v. 18, n. 7/8, p. 549-554, 1990.

HISSEN, A. H. T.; WAN, A. N. C.; WARAS, M. L.; PINTO, L. J.; MOORE, M. M. The *Aspergillus fumigatus* siderophore biosynthetic gene *sidA*, encoding L-Ornithine N<sup>5</sup>-Oxygenase, is required for virulence. **Infection and Immunity**, Burnaby, v. 73, n9, p. 5493-5503, 2005.

HOFFMAN, D. E.; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M. E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell and Environment**, Umea, v. 33, n. 8, p. 1298-1313, 2010.

HONDA, K.; ÔMURA, H.; CHACHIN, M.; KAWANO, S.; INOUE, T. A. Synergistic or antagonistic modulation of oviposition response of two swallowtail butterflies, *Papilio maacki* and *P. protenor*, to *Phellodendron amurense* by its constitutive prenylated flavonoid, Phellamurin. **Journal of Chemical Ecology**, Hiroshima, v. 37, p. 575-581, 2011.

HMDB - THE HUMAN METABOLOME DATABASE. < <https://hmdb.ca/> > Accessed in 11 jun 2021, Canadá, 2007-2020.

JATAV, S.; DWIVEDI, P.; SINGH, M.; SEHRA, N.; MISHRA, B. B. Properties and important molecules of medicinal interest in wood apple (*Aegle marmelos*). In. TEWARI, A.; TIWARI, S. (Ed.). **Synthesis of Medicinal Agents from Plants**. Amsterdam: Elsevier, 2018, p. 127-150.

KAWSAR, S. M. A.; ISLAM, M.; JESMIN, S.; MANCHUR, M. A.; HASAM, I.; RAJIA, S. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxic effect of some uridine derivatives. **International Journal of Bioscience**, Chittagong, v. 12, n. 6, p. 211-219, 2018.

KERWIN, J. L.; TUININGA, A. R.; ERICSSON, L. H. Identification of molecule species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, Seattle, v. 35, p. 1102-1114, 1994.

KEGG PATHWAY DATABASE – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponível em: < <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> > Consultado em: 02 Mai 2021

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of Flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, Allahabad, v. 2013, ID. 162750, 2013.

LEVINE, R. L.; MORONI, L.; BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Maryland, v. 93, n. 26, p. 15036-15040, 1996.

LIND, U.; ROSENBLAD, M. A.; FRANK, L. H.; FALKBRING, S.; BRIVE, L.; LAURILA, J. M.; POHJANOKSA, K.; VUORENPÄÄ, A.; KUKKONEN, J. P.; GUNNARSSON, L.; SCHEININ, M.; LINDBLAD, L. G. E. M.; BLOMBERG, A. Octopamine receptors from the barnacle *Balanus improvisus* are activated by the  $\alpha$ -adrenoceptor agonist Medetomidine. **Molecular Pharmacology**, Gothenburg, v. 78, n. 2, p. 237-248, 2010.

LIU, Y.-Q.; DAI, W.; TIAN, J.; YANG, L.; FENG, G.; ZHOU, X.-W.; KOU, L.; ZHAO, Y.-L.; LI, W.-Q.; LI, L.-H.; LI, H.-Y. Synthesis and insecticidal activities of novel spin-labeled derivatives of camptothecin. **Heteroatom Chemistry**, Lanzhou, v. 22, n. 6, p. 687-691, 2011

LOU, S.; LEVINE, R. L. Methionine in proteins defends against oxidative stress. **The FASEB Journal**, Maryland, v. 23, n. 2, p. 464-472, 2009.

LUO, F.; WANG, Q.; YIN, C.; GE, Y.; HU, F.; HUANG, B.; ZHOU, H.; BAO, G.; WANG, B.; LU, R.; LI, Z. Differential metabolic responses of *Beauveria bassiana* cultured in pupae extracts, root exudates and its interactions with insect and plant. **Journal of Invertebrate Pathology**, Hefei, v. 130, p. 154-164, 2015.

LUQUE, E. M.; GUTIÉRREZ, G.; NAVARRO-SAMPEDRO, L.; OLMEDO, M.; RODRÍGUEZ-ROMERO, J.; RUGER-HERREROS, C.; TAGUA, V. G.; CORROCHANO. A relationship between carotenoid accumulation and the distribution of species of the fungus *Neurospora* in Spain. **Plos ONE**, Sevilla, v. 7, n. 3, ID. e33658, 2012.

MA, J.; TONG, S.; WANG, P.; LIAO, W.; LIU, H.; ZHANG, L. Insecticidal activity of camptothecin against *Nilaparvata lugens*, *Brevicoryne brassicae* and *Chilo suppressalis*. **Journal of Economic Entomology**, Lian-an, v. 103, n. 2, p. 492-496, 2010.

MAOKA, T.; ETOH, T.; BRODINA, A. V.; SOLDATOV, A. A. A series of 19'-Hexanoyloxyfucoxanthin derivatives from the Sea Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Growth in the black sea, Ukraine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Kyoto, v. 59, p. 13059-13064, 2011.

MAOWA, J.; ALAM, A.; RANA, K. M.; DEY, S.; HOSEN, A.; FUJII, Y.; HASAN, I.; OZEKI, Y.; KAWSAR, S. M. A. Synthesis, characterization, synergistic antimicrobial properties and molecular docking of sugar modified uridine derivatives. **Sciend**, Chittagong, v. 3, n. 1, p. 6-21, 2021.

MATSUMAE, H.; FURUI, M.; SHIBATANI, T. Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-Phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 75, n. 2, p. 93-98, 1993.

MENDE, K.; HOMANN, V.; TUDZINSKI, B. The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and expression. **Molecular and General Genetics**, Münster, v. 255, p. 96-105, 1997.

NICHOLAS, D. A.; ZHANG, K.; HUNG, C.; GLASGOW, S.; ARUNI, A. W.; UNTERNAEHRER, J.; PAYNE, K. J.; LANGRIDGE, W. H. R.; DE LEON, M. Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cells secretion of IL-1 $\beta$ . **Plos One**, Loma Linda, v. 12, n. 5, 2017.

NISHIDA, R.; BOWERS, W. S.; EVANS, P. H. Synthetic of highly active juvenile hormone analogs, Juvocimene I and II, from the oil of sweet basil, *Ocimum basilicum* L. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 10, n. 10, p. 1435-1451, 1984.

NUMATA, A.; IBUKA, T. Alkaloids from ants and other insects. In: BROSSI, A. (Ed.). **The Alkaloids: chemistry and pharmacology**, v. 31. Amsterdam: Academic Press, p. 193-315, 1987.

ORMROD, D.; SPENCER, C. M. Topotecan. **Drugs**, Auckland, v. 58, n. 3, p. 533-551, 1999.

PAL, S.; ST LEGER, R. J.; WU, L. P. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the Innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 282, n. 12, p. 8969-8977, 2007.

PATIL, S.; SARRAF, G.; KHARKWAL, A. C. Panorama of *Metarhizium*: Host interaction and its uses in biocontrol and plant growth promotion. In: **Symbiotic soil microorganisms**. Springer: Cham, 2021, p. 289-318.

PELL, J.K; HANNAM, J.J; STEINKRAUS, J.J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, Harpenden, v. 55, p.187–198, 2010

POITEVIN, G.C.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, Curitiba, v. 53(3), p. 323-331, 2018.

PU, X.; QU, X. CHEN, F.; BAO, J. ZHANG, G.; LUO, Y. Camptothecin-producing endophytic *Trichoderma atroviridae* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. **Applied Microbiology and Technology**, Chengdu, v. 97, p. 9365-9375, 2013.

PULIDO, J. M.; GUERRERO, I. S.; MARTÍNEZ, I. J. M.; VALADEZ, B. C.; GUZMAN, G. C. T.; SOLIS, E. S.; CORONA, J. F. G.; SCHRANK, A.; BREMONT, F. J.;

HERNANDEZ, A. G. Isolation, characterization and expression analysis of the ornithine decarboxylase gene (*ODC1*) of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Microbiological Research**, Guanajuato, v. 166, p. 494-507, 2011.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. Na endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, Dortmund, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

REHMAN, S.; SHAWL, A. S.; KOUR, A.; ANDRABI, R.; SUDAN, P.; SULTAN, P.; VERMA, V.; QAZI, G. N. An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Sinagar, v. 44, n. 2, p. 203-209, 2008.

RUSCH, A.; BOMMARCO, R.; EKBOM, B. Conservation Biological Control in Agricultural Landscapes. **Advances in Botanical Research**, Villenave d'Ornon, v. 81, p. 333-360, 2017

SAHA, S.; WALIA, S.; KUMAR, J.; DHINGRA, S.; PARMAR, B. S. Screening for feeding deterrent and insect growth regulatory activity of triterpenic acid saponins from *Diploknema butyracea* and *Sapindus mukorossi*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Uttarakhand, v. 58, p. 434-440, 2010.

SANNAZZARO, A. I.; ÁLVAREZ, C. L.; MENÉNDEZ, A. B.; PIECKENSTAIN, F. L.; ALBERTÓ, E. O.; RUIZ, O. A. Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. **FEMS Microbiology Letters**, Buenos Aires, v. 230, p. 115-121, 2004.

SANTHANAM, R.; LUU, T. V.; WEINHOLD, A.; GOLDBERG, J.; OH, Y.; BALDWIN, I. T. Native root-associated bacteria rescue a plant from sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. **Proceedings of National Academy of Sciences PLUS**, Jena, v. 112, n. 36, p. 5013-5020, 2015.

SANTHANAM, R.; MENEZES, R. C.; GRABE, V.; LI, D.; BALDWIN, I. T.; GROTEN, K. A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. **Molecular Ecology**, Jena, v. 28, n. 5, p. 1154-1169, 2019.

SARAVANAKUMAR K.; YU C.; DOU K.; WANG M.; LI Y.; CHEN J. Sinergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumerinum*. **Biological Control**, Shanghai, v. 94, p. 37-46, 2016.

SARMA, B. K.; YADAV, S. K.; SINGH, S.; SINGH, H. B. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. **Soil Biology and Biochemistry**, Varanasi, v. 87, p. 25-33, 2015.

SCHAEFFLER, A.; GROSS, P.; BUETTNER, R.; BOLLHEIMER, C.; BUECHLER, C.; NEUMAIER, M. KOPP, A.; SCHOELMERICH, J.; FALK, W. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor 4/nuclear factor- $\kappa$ B pathway in adipocytes links nutritional signaling with innate immunity. **Immunology**, Regensburg, v. 126, n. 2, 2009.

SHARMA, C. K.; VISHNOI, V. K.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mug bean. **Rhizosphere**, Haridwar, v. 5, p. 71-75, 2018.

SHIRASUNA, K.; TAKANO, H.; SENO, K.; OHTSU, A.; KARASAWA, T.; TAKAHASHI, M.; OHKUCHI, A.; SUZUKI, H.; MATSUBARA, S.; IWATA, H.; KUWAYAMA, T. Palmitic acid induces interleukin-1 $\beta$  secretion via NLRP3 inflammasomes and inflammatory responses through ROS production in human placental cells. **Journal of Reproductive Immunology**, Kanagawa, v. 116, p. 104-112, 2016.

SINGH, B.; KAUR, A. Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review. **LWT Food Science and Technology**, Punjab, v. 87, p. 93-101, 2018.

SINGKARAVANIT, S.; KINOSHITA, H.; IHARA, F.; NIHIRA, T. Geranylgeranyl diphosphate synthase genes in entomopathogenic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Osaka, v. 85, p. 1463-1472, 2010a.

SINGKARAVANIT, S.; KINOSHITA, H.; IHARA, F.; NIHIRA, T. Cloning and functional analysis of the second geranylgeranyl diphosphate synthase gene influencing helvolic acid biosynthesis in *Metarhizium anisopliae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Osaka, v. 87, p. 1077-1088, 2010b

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, Düsseldorf, v. 24, p. 345-351, 2003.

STUART, A. K. C.; FURUIE, J. L.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Increased mortality of the European Pepper Moth *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera

Crambidae) using entomopathogenic fungal consortia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Curitiba, v. 177, ID. 107503, 2020.

TIMBADIYA, P. N.; MANDAVIA, M. K.; GOLAKIYA, B. A. Phytochemical screening, antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Aegle marmelos* leaf extracts. **International Journal of Chemical Studies**, Gujarat, v. 6, n. 2, p. 3509-3517, 2018.

TRIENENS, M.; ROHLFS, M. Insect-fungus interference competition – The potential role of global secondary metabolite regulation, pathway-specific mycotoxin expression and formation of oxilipins. **Fungal Ecology**, Kiev, v. 5, p. 191-199, 2012.

TSITSIGIANNIS, D. I.; KELLER, N. P. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. **TRENDS in Microbiology**, Norwich, v. 15, n. 3, p. 109-118, 2007.

VALDÉS-SANTIAGO, L.; RUIZ-HERRERA, J. Stress and polyamine metabolism in fungi. **Frontiers in Chemistry**, Irapuato, v. 1, 42, 2014.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2006.

VILAS-BÔAS, S. G.; BOMBERT, A. K. Análise de metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 9, n. 36, p. 58-69, 2006.

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 Regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, Shanghai, v. 282, n. 29, p. 21110-21115, 2007.

WILLIAMS, C. M. A humoral Stimulus to the secretion of the brain-hormone in Lepidoptera. **Nature**, Cambridge, v. 178, p. 213, 1956.

WU, C.-G.; TIAN, J.-L.; LIU, R.; CAO, P.-F.; ZHANG, T.-J.; REN, A.; SHI, L. ZHAO, M. W. Ornithine decarboxylase-mediated production of putrescine influences ganoderic acid biosynthesis by regulation of reactive oxygen species in *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Jiangsu, v. 83, n. 20, e01289-17, 2017.



YANG, W.; ZHENG, L.; LIU, H.-X.; WANG, K.-B.; YU, Y.-Y.; LUO, Y.-M.; GUO, J.-H. Evaluation of the effectiveness of a consortium of three plant-growth promoting rhizobacteria for biocontrol of cotton Verticillium-wilt. **Biocontrol Science and Technology**, Huaian, v. 24, n. 5, p. 489-502, 2014.

YAP, T. A.; GARRETT, M. D.; WALTON, M. I.; RAYNAUD, F.; BONO, J. S.; WORKMAN, P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls and promises. **Current Opinion in Pharmacology**, Sutton, v. 8, p. 393-412, 2008.

YU, W.; WANG, M.; ZHANG, H.; QUAN, Y.; ZHANG, Y. Expression and functional analysis of storage protein 2 in the silkworm *Bombyx mori*. **International Journal of Genomics**, Zhejiang, v. 2013, ID. 145450, 2013.

ZHANG, C.; WANG, W.; LU, R.; JIN, S.; CHEN, Y.; FAN, M.; HUANG, B.; LI, Z.; HU, F. Metabolic responses of *Beauveria bassiana* to hydrogen peroxide-induced oxidative stress using an LC-MS-based metabolomics approach. **Journal of Invertebrate Pathology**, Hefei, v. 137, p. 1-9, 2016.

ZHANG, H.; JIANG, H.; ZHANG, H.; LIU, J.; HU, X.; CHEN, L. Anti-tumor efficacy of phellamurin in osteosarcoma cells: involvement of the PI3K/AKT/mTOR pathway. **European Journal of Pharmacology**, Kaifeng, v. 858, ID. 172477, 2019.

ZHANG, X.-U.; LI, Q.-H.; XU, Z.-D.; DOU, J.-J. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medicine science: a systematic review. **RSC Advances**, v. 10, p. 3092-3104, 2020.

ZHANG, Y.-L.; LI, S.; JIANG, D.-H.; KONG, L.-C.; ZHANG, P.-H.; XU, J.D. Antifungal activity of metabolites produced by a termite-associated *Streptomyces canus* BYB02. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Nanjing, v. 61, p. 1521-1524, 2013.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; KUHN, T. A.; ARAUJO, E.; DOLCI, E.; SANTOS, B.; SILVA, C.; BENATTO, A.; VIDAL, H. Novo Desafio. **Cultivar HF** · agosto / setembro, Curitiba, p. 31-32, 2011.

ZAWADNEAK, M. A. C.; BOTTON, M.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; VIDAL, H. R. **Pragas do morangueiro**, in: ZAWADNEAK, M. A. C.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, Á.F. (Eds.), Como produzir morangos. Ed. UFPR, Curitiba, 280p, 2014.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; PIMENTEL, I. C.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B., POLTRONIERI, A. S.; SOLIS, M. A. First record of *Duponchelia*

*fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, Curitiba, V. 34, n. 3, p. 91–95, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; POLTRONIERI, A. S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A. M.; BOSBA, A. M.; PIMENTEL, I. C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, Curitiba, v. 114, p. 291-294, 2017.

ZAWADNEAK, M. A. C.; VIDAL H. R.; SANTOS B. **Lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller**. In: Vilela, E. F., R. A Zucchi. (ed). *Pragas Introduzidas no Brasil, insetos e ácaros*, FEALQ, Piracicaba, Brasil, 2015.

ZHOU, Y.; WU, C.; SHENG, Q.; JIANG, C.; CHEN, Q.; LV, Z.; YAO, J.; NIE, Z. Lysine acetylation stabilizes SP2 protein in the silkworm *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, Hangzhou, v. 91, p. 56-62, 2016.

ZHU, X.-M.; LI, L.; WU, M.; LIANG, S.; SHI, H.-B.; LIU, X.-H.; LIN, F.-C. Current opinion on autophagy in pathogenicity of fungi. **Virulence**, Hangzhou, v. 10, n. 1, p. 481-489, 2018.

ZOU, H.; LI, L.; ZHANG, T.; SHI, M.; ZHANG, N.; HUANG, J.; XIAN, M. Biosynthesis and biotechnological application of non-canonical amino acids: complex and unclear. **Biotechnology Advances**, Qingdao, v. 36, n. 7, p. 1917-1927, 2018.

APÊNDICE 1 – LISTA DE METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR GC-MS NAS  
LAGARTAS MORTAS PELO CONSÓRCIO

Metabólito	ID Nist
1-ethyl-1-(2-methylpropyl)-Hydrazine	37202-mainlib
1-Isobutylsulfanylmethyl-2,8,9-trioxa-5-aza-1-sila-bicyclo[3.3.3]undecane	144269-mainlib
1-Monopalmitin	37037-mainlib
1,2-Ethenediol	37234-mainlib
1,3-Butanediol	9344-replib
(2-Ethoxyethoxy)acetic acid	37193-mainlib
2-deoxy-D-Erythro-Pentopyranose	38368-mainlib
2-Hydroxyglutaric acid	38518-mainlib
2-Keto-d-gluconic acid	38850-mainlib
2-Palmitoylglycerol	100701-mainlib
2-pyrrolidinone	20964-replib
2,5-Dimethoxymandelic acid	180081-mainlib
4-Aminobutanoic acid	143908-mainlib
5-Aminovaleric acid	143939-mainlib
5-Methyluridine	39480-mainlib
Acetic acid	119424-mainlib
Adenine	188798-mainlib
Alanine	86265-mainlib
alpha-D-Mannopyranose	164557-mainlib
alpha-D-(+)-Talopyranose	39379-mainlib
alpha-Methyl-L-tyrosine	39627-mainlib
Adrenaline	86262-mainlib
Ala-beta-Ala	86255-mainlib
Alanylglycine	86256-mainlib
Aminomalonic acid	38864-mainlib
Ammelide	204743-mainlib
Asparagine	9095-replib
Atenolol	116930-mainlib
Aucubin	37875-mainlib
b-Aminoisobutyric acid	39144-mainlib
Bis[2-(trimethylsilyloxy)ethyl] Ether	38410-mainlib
Butanedioic acid	119441-mainlib
Cadaverine	143920-mainlib
Citric acid	191513-mainlib
Citrulline	37554-mainlib
Cystathionine	171347-mainlib

Metabolito	ID Nist
Cysteine	172585-mainlib
Cytidine	39582-mainlib
D-(-)-Lyxofuranose	170821-mainlib
D-(-)-Tagatofuranose	39490-mainlib
D-(+)-Galacturonic acid	39387-mainlib
D-Galactofuranose phosphate	39967-mainlib
D-Galactose	9365-replib
D-Glucitol	40094-mainlib
D-Xylopyranose	39394-mainlib
D-Mannose	164553-mainlib
D-Psicofuranos	39492-mainlib
D-Sorbitol	38923-mainlib
D-Xylose	39397-mainlib
Deoxyglucose	39363-mainlib
Deoxyguanosine	39860-mainlib
Diisooctyl phthalate	21799-replib
Ethyl .alpha.-D-glucopyranoside	164509-mainlib
Ethyl phosphoric acid	168481-mainlib
Erythronic acid	38909-mainlib
Formamide	119440-mainlib
Fumaric acid	182607-mainlib
Galactaric acid	9634-replib
Gallic acid	39872-mainlib
Glucosamine	164009-mainlib
Glucopyranose	39377-mainlib
Glucopyranose phosphate	39403-mainlib
Glyceric acid	38809-mainlib
Glycerol	39414-mainlib
Glycerol monostearate	86865-mainlib
Glycerol-3-phosphate	40201-mainlib
Glyceryl-glycoside	164510-mainlib
Glycine	24429-replib
Guanine	205519-mainlib
Guanosine	40113-mainlib
Gulonic acid	40134-mainlib
Hypoxanthine	189064-mainlib
Inosine	39534-mainlib
Isoleucine methyl ester	130527-mainlib
Isoxanthopterin	208122-mainlib

Metabolito	ID Nist
L-(+)-Tartaric acid	38907-mainlib
Lactic acid	38429-mainlib
L-Aspartic acid	39626-mainlib
Leu-Gly	130516-mainlib
Levodopa	39555-mainlib
L-fucose	39381-mainlib
L-Glutamic acid	182910-mainlib
L-Glutamine	39000-mainlib
L-Histidine	127203-mainlib
L-Homocystine, [S-(R*,R*)]-	9264-replib
L-Homoserine	171358-mainlib
L-Isoleucine	130529-mainlib
L-Leucine	130526-mainlib
L-Lysine	39149-mainlib
L-Methionine	145224-mainlib
L-Norleucine	39020-mainlib
L-Proline	9291-replib
L-threonine	38447-mainlib
L-Tryptophan	163567-mainlib
L-Valyl-L-leucine	116931-mainlib
Lyxose	39380-mainlib
Malic acid	38880-mainlib
Mannitol	38929-mainlib
meso-Erythritol	38855-mainlib
Methyl galactoside	39358-mainlib
Methyl phosphate	180906-mainlib
Mevalonic acid	38757-mainlib
Monostearin	209278-mainlib
Myoinositol 1-phosphate	38857-mainlib
Myo-Inositol	9617-replib
N-Acetyl-D-glucosamine	142585-mainlib
N-alpha-Acetyl-L-Lysine	143916-mainlib
N-Methyl-L-prolinol	48768-mainlib
N-methyl-n-butoxycarbonyl-, octyl ester, Alanine	130618-mainlib
N-methyl-N-methoxycarbonyl-, undecyl ester, Alanine	86442-mainlib
N-methoxycarbonyl-, isohexyl ester, L-Norleucine	117068-mainlib
N-ethoxycarbonyl-, nonyl ester, L-Norvaline	117448-mainlib
Norephedrine	130522-mainlib

Metabólito	ID Nist
Oxalic acid	38695-mainlib
Ornithine	115343-mainlib
Phenylalanine	39552-mainlib
Palmitic Acid	86863-mainlib
Phenylpropanolamine	86253-mainlib
Pipecolic acid	129208-mainlib
Propanedioic acid	38742-mainlib
Pseudo uridine	39533-mainlib
Putrescine	143937-mainlib
Pyroglutamic acid	49101-mainlib
Ribitol	9203-replib
Ribonic acid	38766-mainlib
Serine	164581-mainlib
Thymine	185875-mainlib
trans-9-Octadecenoic acid	9113-replib
Tyramine	24434-replib
Tyrosine	147068-mainlib
Uracil	38117-mainlib
Urea	120080-mainlib
Uridine	39489-mainlib
Valine	36240-mainlib
Val-Val	116932-mainlib

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: Mainlib: *main EI MS Database*; Replib: *replicate spectra Database*

APÊNDICE 2 – LISTA DE METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR GC-MS NAS  
LAGARTAS SOBREVIVENTES

Metabólito	ID Nist
1,2,3-Butanetriol	38436-mainlib
1,3-Butanediol	9344-replib
1,3-Dioxolane-2-methanol	37117-mainlib
1,4-lactone, Allonic acid	38863-mainlib
1-Hydroxy-3-methoxy-6-methylanthraquinone	202196-mainlib
1-Monopalmitin	37037-mainlib
2,5-Dimethoxymandelic acid	180081-mainlib
2-Deoxy-erythro-pentonic acid	38732-mainlib
2-Hydroxyglutaric acid	38518-mainlib
2-Keto-d-gluconic acid	38850-mainlib
2-Ketoglutaric acid	38939-mainlib
2-Ketovaleric acid	37599-mainlib
2-O-Glycerol-alpha-d-galactopyranoside	164496-mainlib
2-methyl-Propanetriol	39557-mainlib
2-oxo-Propanoic acid	119415-mainlib
2-Palmitoylglycerol	100701-mainlib
2-pyrrolidinone	20964-replib
4-Aminobutanoic acid	143908-mainlib
4-Hydroxybenzoic acid	189627-mainlib
5-Methyluridine	39480-mainlib
6-Fluoro-alpha-methyltryptamine	86261-mainlib
Acetic acid	119424-mainlib
Adenine	188798-mainlib
Adenosine	39649-mainlib
Adenosine-5'-monophosphate	39093-mainlib
Adrenaline	86262-mainlib
Alanine	86265-mainlib
alpha-D-(+)-Talopyranose	39379-mainlib
alpha-D-Mannopyranose	164557-mainlib
alpha-Methyl-L-tyrosine	39627-mainlib
alpha-Linolenic acid	41218-mainlib
Aminomalonic acid	38864-mainlib
Asparagine	9095-replib
Aucubin	37875-mainlib
beta-D-Fructofuranose phosphate	39544-mainlib
beta-Hydroxypyruvic acid	38693-mainlib
beta-L-(-)-Fucopyranose	164541-mainlib
beta-L-Arabinopyranose	39392-mainlib
Butanedioic acid	119441-mainlib
Caffeic acid	9539-replib
Citric acid	191513-mainlib
Cystathionine	171347-mainlib

Metabolito	ID Nist
Cysteine	172585-mainlib
D-(-)- Erythrofuranose	38812-mainlib
D-(-)-Fructofuranose	39494-mainlib
D-(-)-Tagatofuranose	39490-mainlib
D-(+)-Galactopyranose	164535-mainlib
D-(+)-Galacturonic acid	39387-mainlib
D-(+)-Talofuranose	170819-mainlib
D-2-Aminobutyric acid	26266-mainlib
D-Erythrotetrofuranose	38865-mainlib
D-Fructose phosphate	40042-mainlib
D-Galactose	9365-replib
D-Mannopyranose phosphate	39404-mainlib
D-Mannose	164553-mainlib
D-Xylose	39397-mainlib
D-Xylopyranose	39394-mainlib
Deoxyglucose	39363-mainlib
Diisooctyl phthalate	21799-replib
Erythronic acid	38909-mainlib
Ethanimidic acid	119576-mainlib
Ethyl .alpha.-D-glucopyranoside	164509-mainlib
Formamide	119440-mainlib
Fumaric acid	182607-mainlib
Galactaric acid	9634-replib
Gallic acid	39872-mainlib
Gluconic acid	39362-mainlib
Glucuronic acid	39391-mainlib
Glucopyranose	39377-mainlib
Glucopyranose phosphate	39403-mainlib
Glyceric acid	38809-mainlib
Glycerol	39414-mainlib
Glycerol monostearate	86865-mainlib
Glycerol-3-phosphate	40201-mainlib
Glyceryl-glycoside	164510-mainlib
Glycine	24429-replib
Guanine	205519-mainlib
Guanosine	40113-mainlib
Gulonic acid	40134-mainlib
Hypoxanthine	189064-mainlib
Inosine	39534-mainlib
Isoxanthopterin	208122-mainlib
L-(-)-Arabitol	38768-mainlib
L-(+)-Tartaric acid	38907-mainlib
Lactic acid	38429-mainlib
Lanthionine	39550-mainlib
L-Aspartic acid	39626-mainlib



Metabólito	ID Nist
Levoglucosan	39390-mainlib
L-fucose	39381-mainlib
L-Glutamic acid	182910-mainlib
L-Glutamine	39000-mainlib
L-Histidine	127203-mainlib
L-Homocystine, [S-(R*,R*)]-	9264-replib
L-Homoserine	171358-mainlib
L-Isoleucine	130529-mainlib
L-Leucine	130526-mainlib
L-Lysine	39149-mainlib
L-Proline	9291-replib
L-Threitol	38853-mainlib
L-Threonic acid	38908-mainlib
L-threonine	38447-mainlib
L-Tryptophan	163567-mainlib
Lyxose	39380-mainlib
Malic acid	38880-mainlib
Mannitol	38929-mainlib
meso-Erythritol	38855-mainlib
Methyl galactoside	39358-mainlib
Methyl phosphate	180906-mainlib
Methylmaleic acid	21394-replib
Monostearin	209278-mainlib
Myoinositol 1-phosphate	38857-mainlib
Myo-Inositol	9617-replib
N-Acetyl-D-glucosamine	142585-mainlib
N-alpha-Acetyl-L-Lysine	143916-mainlib
N-methyl-N-methoxycarbonyl-, hexyl ester, Alanine	86440-mainlib
N-methyl-N-methoxycarbonyl-, undecyl ester, Alanine	86442-mainlib
Oleamide	6997-replib
Oleanitrile	2502-mainlib
Oxalic acid	38695-mainlib
Ornithine	115343-mainlib
Phenylalanine	39552-mainlib
Palmitic Acid	86863-mainlib
Phenylpropanolamine	86253-mainlib
Phthalic acid	180295-mainlib
Pipecolic acid	129208-mainlib
Propanedioic acid	38742-mainlib
Pseudo uridine	39533-mainlib
Putrescine	143937-mainlib
Pyroglutamic acid	49101-mainlib
Ribitol	9203-replib
Serine	164581-mainlib

Metabólito	ID Nist
trans-9-Octadecenoic acid	9113-replib
Tyrosine	147068-mainlib
Uracil	38117-mainlib
Urea	120080-mainlib
Uric acid	40345-mainlib
Uridine	39489-mainlib
Uridine-5'-monophosphate	39096-mainlib
Valine	36240-mainlib
Xylitol	9521-replib

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: Mainlib: main EI MS Database; Replib: replicate spectra Database

# **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 6.1 CONCLUSÃO GERAL

Os fungos possuem um metabolismo dinâmico, podendo produzir metabólitos bioativos em resposta à diferentes estímulos. O presente trabalho foi o primeiro do ramo a avaliar a compatibilidade de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para a formação de um consórcio fúngico capaz de promover o controle de *D. fovealis*. Nós concluímos que um consórcio formado por duas linhagens de *B. bassiana*, embora sendo da mesma espécie, é capaz de promover um aumento na mortalidade desta praga em até 17%, além de promover um aumento na produção de enzimas líticas importantes para o controle biológico de pragas, como as quitinases. Constatamos ainda que as duas linhagens atuando em conjunto induzem a produção de diferentes metabólitos que podem atuar neste controle, além de possuírem diferentes funções que podem ser abordadas por outras áreas de estudo.

Os metabólitos encontrados podem ser divididos em MECANISMO DE DEFESA DA LAGARTA (FIGURA 1): os quais acreditamos estarem envolvidos na defesa de *D. fovealis* contra o ataque promovido pelo consórcio fúngico. Neste caso, detectam-se alguns glicerofosfolipídios que possuem as mais diversas ações dentro da célula, mas podem atuar como moléculas de defesa, bem como na produção de moléculas de comunicação como as prostaglandinas e leucotrienos. Além disso, foram detectadas moléculas que atuam diretamente no recrutamento de células inflamatórias e indução do processo inflamatório e produção de stress oxidativo. Por fim, foram identificados metabólitos com atividade fungicida que atuam na defesa de *D. fovealis* contra a infecção pelo consórcio fúngico. Esse conjunto de metabólitos, aparentemente é capaz de manter algumas lagartas vivas por mais tempo que as demais, induzindo uma certa resistência à infecção. Em contrapartida, temos os metabólitos produzidos pelos fungos como MECANISMO DE INFECÇÃO PELO CONSÓRCIO (FIGURA 2): os metabólitos envolvidos no mecanismo de infecção pelo consórcio estão divididos basicamente em três etapas, a etapa de penetração no inseto, que envolve germinação dos conídios, formação de estruturas de infecção, como apressórios e blastósporos, esporulação e penetração na cutícula. Uma vez dentro do inseto, os fungos passam a produzir moléculas de defesa, que tem por objetivo evadir o sistema imune do inseto, como moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias, que irão atuar contra o estresse oxidativo produzido pela lagarta, bem como reduzir a resposta imune, reduzindo o recrutamento celular e outros

mecanismos de defesa. Por fim a etapa de colonização e morte, onde o consórcio passa a produzir metabólitos que atuam como fatores de virulência, que atuarão na mortalidade da lagarta com ação inseticida direta ou indireta.

Ao final podemos supor que, embora algumas lagartas inicialmente tenham sido capazes de sobreviver ao ataque fúngico pelo período de sete dias, possivelmente irão sucumbir a ação do consórcio de forma mais lenta, causado principalmente pela ação de metabólitos com eficácia inseticida tardia. Desta forma, trabalhar com consórcios fúngicos ao invés dos fungos isoladamente, para o controle biológico de pragas na agricultura, em especial contra *D. fovealis*, pode ser um recurso valioso uma vez que sua efetividade é consideravelmente aumentada.

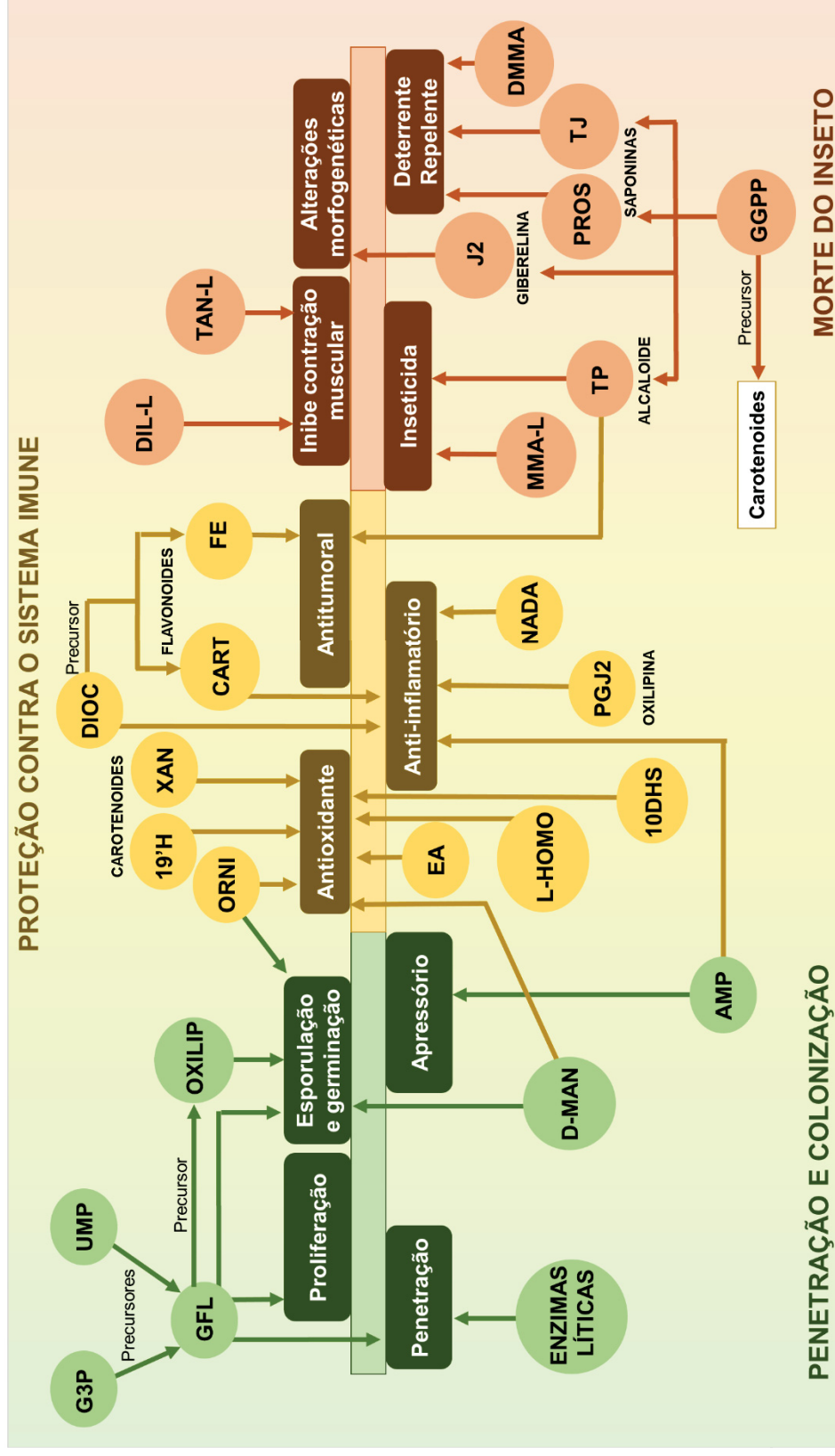
FIGURA 1 –O MECANISMO DE DEFESA DA LAGARTA ENVOLVE A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS OXIDATIVAS, QUE GERAM O ESTRESSE OXIDATIVO. PARA PROTEGER AS CÉLULAS E SEU PRÓPRIO ORGANISMO, A LAGARTA PRODUZ MOLÉCULAS DE PROTEÇÃO CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO, DE MODO QUE O MESMO APENA ATUE SOBRE OS FUNGOS. ALÉM DISSO A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS, COMO AMA-C E URIDINA, QUE SÃO POTENTES ANTIFÚNGICOS, TAMBÉM ESTÃO SENDO INDUZIDOS. DESTA FORMA, A LAGARTA É CAPAZ DE SE PROTEGER E ATACAR AO MESMO TEMPO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: ROS: espécies reativas de oxigênio; NOS: espécies reativas e nitrogênio;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio; L-NOR: L-norleucina; D-ETF: D-Eritrotetrofuranose; AMA-C: Aegle marmelos alcaloide C; N-ACT-L-LYS: N- $\alpha$ -Acetil-L-Lisina; GFL: Glicerofosfolipídios; 2PG: 2-Palmitoilglicerol.

FIGURA 2 – A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS PELO CONSÓRCIO PODE SER DIVIDIDO EM TRÊS ETAPAS: A ETAPA DE PENETRAÇÃO NO INSETO, QUE ENVOLVE A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS QUE IRÃO DESENCADEAR DIVERSOS PROCESSOS COMO GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO, PARA FACILITAR SUA PENETRAÇÃO NO INSETO; A ETAPA DE PROTEÇÃO CONTRA O SISTEMA IMUNE DO INSETO, QUE CONSISTE NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS COM AÇÃO ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA, QUE IRÃO DRIBLAR O SISTEMA IMUNE DO INSETO, E A TERCEIRA ETAPA É DE COLONIZAÇÃO E MORTE, ONDE O CONSÓRCIO IRÁ PRODUIR METABÓLITOS COM AÇÃO INSETICIDA, PROVOCANDO PARALISIA E MORTE DO INSETO. TODAS ESTAS ETAPAS OCORREM SIMULTANEAMENTE E OS METABÓLITOS ENVOLVIDOS EM CADA ETAPA ESTÃO DIRETAMENTE INTERLIGADOS, ATUANDO COMO PRECURSORES DE OUTRAS MOLÉCULAS TAMBÉM RELACIONADAS À INFECÇÃO E INDUZINDO A ATIVAÇÃO DE GENES PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS TÓXICOS AO INSETO.



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: G3P: Glicerol-3-fosfato; GFL: Glicerofosfolípidios; UMP: Uridina-5'-monofosfato; OXILIP: oxilipinas; D-MAN: D-manose; AMP: Adenosina-5'-monofosfato; ORNI: ornitina; 19'H: 19-Hexanoiloximtiloxantina; XAN: xantina; DIOC: ácido 1,4-Di-O-cafeoilquinico; CART: Cartamina 6,7-diglicosídeo; FE: Felamurina; EA: Ácido Etanimídico; L-HOMO: L-Homocisteína; 10DHS: [10]-Dehidrosogoaol; PGJ2: Prostaglandina J2; NADA: N-araquidonoil dopamina; DIL-L: difitazem-like; TAN-L: tansulosina-like; MMA-L: malation-like; TP: Topotecano; GGPP: geranigeranil difosfato; J2: Juvocimeno 2; PROS: Prosapogenina; TJ: tuberódsido J; DMMA: ácido 2,5-Dimetoximandelico.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ABEYRATNE-PERERA, H. K.; CHANDRAN, P. L. Mannose surfaces exhibit self-latching, water-structuring, and resilience to chaotropes: implications for pathogen virulence. *Langmuir*, Washington, v. 33, n. 36, p. 9178-9189, 2017.

AGARWAL, M; WALIA, S.; DHINGRA, S.; KHAMBAY B. P. S. Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. **Pest Management Science**, New Delhi, v. 57, p. 289-300, 2001.

ALAMRI, S.; MOSTAFA, Y. S.; HASHEM, M.; ALRUMMAN, S. Enhancing the biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* JF419706 through cell wall degrading enzyme production. **International Journal of Agriculture and Biology**, Abha, v. 18, n. 4, p. 765-772, 2016.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba-SP: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz Publishers, 1988.

ALVIN A.; MILLER K. I.; NEILAN B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, Sydney, v. 169, p. 483-495, 2014.

AMATUZZI, R. F.; POITEVIN, C. G.; POLTRONIERI, A. S.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to Soil-Borne Entomopathogenic Fungi. **Insects**, Curitiba, v.9, n. 2, p. 70, 2018a.

AMATUZZI, R. F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; DALZOTO, P.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, Curitiba, v.78, n. 3, p. 429-435, 2018b

AMNA, T.; PURI, S. C.; VERMA, V.; SHARMA, J. P.; KHAJURIA, R. K.; MUSSARAT, J.; SPITELLER, M.; QAZI, G. N. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. **Canadian Journal of Microbiology**, Jammu, v. 52, p. 189-196, 2006.

ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; JUNIOR, C. R. Morango – Crescimento constante em área de produção. **Anuário HF 2020 - Campo e Negócios**, p. 88-92, 2020.



ANTUNES, L. E. C.; JUNIOR, C. R. Fragoli, i produttori brasiliani mirano all'esportazione in Europa. **Frutticoltura**. v. 69, p. 60-65, 2007.

ARAUJO, E. S.; BENATTO, A.; RIZZATO, F. B.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Combining biocontrol agentes with different mechanisms of action to control *Duponchelia fovealis*, an invasive pest in South America. **Crop Protection**, Curitiba, v. 134, p. 105184, 2020a.

ARAUJO, E. S.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; MIRÁS-AVALOS, J. M.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Compatibility between entomopathogenic fungi and egg parasitoid (Trichogrammatidae): A laboratory study for their combined use to control *Duponchelia fovealis*. **Insects**, Curitiba, v. 11, n. 9, p. 1-14, 2020b.

ARAÚJO, J. P. M.; HUGHES, D. P. Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body? In: LOVET, B.; ST LEGER, R. J. (Eds.). **Advances in Genetics – Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic fungi**. Vol. 94. Pennsylvania: Academic Press, 2016, p.1–39.

AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: DE MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Vol. 1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. 69-96.

BALAKUMAR, S.; RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Antifungal activity of *Aegle marmelos* (L.) Correa (Rutaceae) leaf extracts on dermatophytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Tamil Nadu, p. 309-312, 2011.

BALE J. S.; VAN LENTEREN J. C.; BIGLER F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transaction of The Royal Society B**, Birmingham, v. 363, p. 761-776, 2008.

BANG, I. S. JAK/STAT signaling in insect innate immunity. **Entomological Research**, Asan, v. 49, p. 339-353, 2019

BARDET, A. **Main phytosanitary problems on strawberry in France**. COST863 WG2 and WG3 Joint SGM, Plant health in changing environment. MTT Agrifood Research, Jokioinen, Finland, 2008.

BARTHEL, W. F.; LEON, J.; HALL, S. A. Insect repellents. I. Esters of mandelic acid and substituted mandelic acids. **The Journal of Organic Chemistry**, Maryland, v. 19, n. 4, p. 485-489, 1954.

BECCACCIOLI, M.; REVERBERI, M.; SCALA, V. Fungal lipids: biosynthesis and signaling during plant-pathogen interactions. **Frontiers in Bioscience**, Rome, v. 24, p. 172-185, 2019.

BENATTO, A.; SOUZA, M. T., SOUZA, M. T.; MÓGOR, A. F.; PIMENTEL, I. C.; ZAWADNEAK, M. A. C. Sampling methods and meteorological factors on pests and beneficial organisms in strawberries. **EntomoBrasilis**, v. 14, e926, 2021.

BENICÁ, P. C.; ATAIDE, J. O.; FRAGOSO, D F. M.; PRATISSOLI, D. Controle da lagarta do morangueiro pelo bioinseticida *Bacillus thuringiensis*. In. Anais da 30<sup>a</sup> Semana Acadêmica do Curso de Agronomia do CCA/UFES-SEAGRO, 28<sup>o</sup>, 2017, Alegre. **Anais...** Alegre: UFES – SEAGRO, 2017, p. 1-4.

BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA, D. E.; ZAWADNEAK, M. A. C. **Guia para identificação e monitoramento de pragas e seus inimigos naturais em morangueiro**. Brasília: Embrapa, 2015, 46p.

BERINI, F.; KATZ, C.; GRUZDEV, N.; CASARTELLI, M.; TETTAMANTI, G.; MARIANELLI, F. Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances**, Varese, v. 36, n. 3, p. 818-838, 2018

BETHKE, J. A.; VANDER MEY, B. Pest alert: *Duponchelia fovealis*. **University of California Cooperative Extension San Diego**. San Diego, 2010.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Halifax v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BLOSZYK, E.; NAWROT, J.; HARMATHA, J.; DROZDZ, B.; CHMIELEWICZ, Z. Effectiveness of antifeedants of plant origin in protection of packaging materials against storage insects. **Journal of Applied Entomology**, Poznan, v. 110, p. 96-100, 1990.

BONSIGNORE, C. P.; VACANTE, V. *Duponchelia fovealis* (Zeller). A new emergency for Strawberry? **Protezione delle colture**, Reggio Calabria, v. 3, p. 40-43, 2010.

BOWERS, W. S. Phytochemical defenses targeting the insect endocrine system. **Acta Botanica Gallica**, Tucson, v. 144, n. 4, p. 391-400, 1997.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida. **FDACS - Division of Plant Industry**, Florida, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos e Alimentos**. 2016. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos> > Consultado em: 05 de jun de 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes da Área Vegetal, 2019**. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pncrc-vegetal/arquivos/21-portaria-no-267-de-11-de-dezembro-de-2019-publicacao-de-resultados-2015-a-2018.pdf> >. Consultado em: 07 Jun 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - **Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins** (AGROFIT). Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Consultado em: 15 mai 2021

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio\\_nacional\\_vigilancia\\_poppopulac\\_expostas\\_agrotoxicos.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_poppopulac_expostas_agrotoxicos.pdf)>. Consultado em: 05 jun 2021

BRODOWSKY, I. D.; OLIW, E. H. Biosynthesis of 8R-hydroperoxylinoleic acid by the fungus *Laestisaria arvalis*. **Biochimica and Biophysica Acta**, Uppsala, v. 1168, p. 68-72, 1993.

BRODINA, A. V. **Carotenoids in tissues of the black sea molluscs with different types of nutrition**. 2013. 23 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev.

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster* – from microbial recognition to whole-organism physiology. **Nature Reviews**, New York, v. 14, p. 797-810, 2014

BUDZINSKI, I. G. F.; MOON, D. H.; MOROSINI, J. S.; LINDÉN, P.; BRAGATTO, J.; MORITZ, T.; LABATE, C. A. Integrated analysis of gene expression from carbon

metabolism, proteome and metabolome, reveals altered primary metabolism in *Eucalyptus grandis* bark, in response to seasonal variation. **BMC Plant Biology**, Piracicaba, v. 16, n. 149, p. 1-15, 2016.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.-L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, Strasbourg, v. 23, p. 329-344, 1999.

CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International). Selected sections for: *Duponchelia fovealis* (southern European marshland pyralid). Crop Protection Compendium. **Invasive Species Compendium** (Beta). Disponível em: < <https://www.cabi.org/what-we-do/invasive-species/> > Consultado em: 02 jun 2021.

CALMES, B.; MOREL-ROUHIER, M.; BETAILLÉ-SIMONEAU, N.; GELHAYE, E.; GUILLEMETTE, T.; SIMONEAU, P. Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of *Alternaria brassicola*. **BMC Microbiology**, Angers Cedex, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2015.

CALVO, A. M.; GARDNER, H. W.; KELLER, N. P. Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. **The Journal of Biological Chemistry**, Texas, v. 276, n. 28, p. 25766-25774, 2001.

CANFORA, L.; ABU-SAMRA, N.; TARTANUS, M.; LABANOWSKA, B. H.; BENEDETTI, A.; PINZARI, F.; MALUSÀ, E. Co-inoculum of *Beauveria brongniartii* and *B. bassiana* shows *in vitro* different metabolic behavior in comparison to single inoculums. **Scientific Reports**, Roma, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

CARVALHO, S. P. Histórico e evolução da cultura do morangueiro no Brasil nos últimos 50 anos. **Revista de Horticultura Brasileira**, Viçosa, v. 29, n. 2, CD-ROM, 2011

CHAFFMAN, M.; BROGDEN, R. N. Diltiazem. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, Auckland, v. 29, p. 387-454, 1985.

CHAN, Y-L.; CAI, D.; TAYLOR, P. W. J.; CHAN, M-T.; YEH, K. W. Adverse effect of the chitinolytic enzyme PjCHI-1 in transgenic tomato on egg mass production and embryo development of *Meloidogyne incognita*. **Plant Pathology**, Taipei, v. 59, p. 922-930, 2010.

CHEN, C. C.; WEI, B. L.; LOKE, S. H.; CHIOU, W. F. 3,4-Di-O-Caffeoylquinic acid protects endothelial cells against oxidative stress and restores endothelium-

dependent vasodilatation. **Journal of Chinese Medicine**, Taiwan, v. 18, n. 1-2, p. 89-100, 2007.

CHERNIN, L.; CHET, I. Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. In: BURNS, R. G.; DICK, R. P. **Enzymes in the environment**. New York: CRC Press, 2002. p179-234.

CHIOU, W. F.; CHEN, C. C.; WEI, B. L. 3,4-Di-O-Caffeoylquinic acid inhibits angiotensin-II-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by downregulating the JNK and PI3K/Akt signaling pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Taiwan, v. 2011, ID.634502, 2011.

CHITRAKAR, I.; KIM-HOLZAPFEL, D. M.; ZHOU, W.; FRENCH, J. B. Higher Order Structures in Purine and Pyrimidine Metabolism. **Journal of Structural Biology**, Nova York, v. 197, n. 3, p. 354-364, 2017.

CHITTY, J. L.; FRASER, J. A. Purine Acquisition and Synthesis by Human Fungal Pathogens. **Microorganisms**, Queensland, v. 5, n. 33, p. 1-16, 2017.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, Quebec, e86, v. 68, 2019.

CHRISTENSEN, S. A.; KOLOMIETS, M. V. The lipid language of plant-fungal interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Texas, v. 48, p. 4-14, 2011.

CRESPO, R.; PEDRINI, N.; JUÁREZ, M. P.; DAL BELLO, G. M. Volatile organic compounds released by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiological Research**, La Plata, v. 163, p. 148-151, 2008.

CRUZ-ESTEBAN, S.; ROJAS, J.C. Pheromone-Baited Traps Confirm the Presence of *Duponchelia fovealis* in Strawberry Crops in Mexico. **Southwestern Entomologist**, Michoacán, v. 46, n. 2, p. 533-536, 2021.

DE VRIEZE, M.; GERMANIER, F.; VUILLE, N.; WEISSKOPF, L. Combining different potato-associated *Pseudomonas* strains for improved biocontrol of *Phytophthora infestans*. **Frontiers in Microbiology**, Fribourg, v. 9, ID. 2573, 2018.

DESPRÉS, L.; DAVID, J.-P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **TRENDS in Ecology and Evolution**, Grenoble, v. 22, n. 6, p. 298-307, 2007.

DEVI, S. R.; JESMIN, S.; RAHMAN, M.; MACHUR, M. A.; FUJII, Y.; OZEKI, Y.; KAWSAR, S. M. A. Microbial efficacy and two steps synthesis of uridine derivatives with spectral characterization. **Acta Pharmaceutica Scientia**, Chittagong, v. 57, n. 1, 2019.

DING, J.-L.; HOU, J.; FENG, M.-G.; YING, S.-H. Transcriptomic analysis reveal comprehensive responses of insect hemocytes to mycopathogen *Beauveria bassiana*, and fungal virulence-related cell wall protein assists pathogen to evade host cellular defense. **Virulence**, Hangzhou, v. 11, n. 1, p. 1352-1365, 2020.

DIXON, R. A., GANG, D. R.; CHARLTON, A. J.; FIEHN, O.; KUIPER H. A.; REYNOLDS, T. L.; TJEERDEMA, R. S.; JEFFERY, E. H.; GERMAN, B.; RIDLEY, W. P.; SEIBER, J. N. Applications of metabolomics in agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oklahoma, v. 54, p. 8984-8994, 2006.

DONOVAN, M.; SCHUMUKE, J. J.; FONZI, W. A.; BONAR, S. L.; GHEESLING-MULLIS, K.; JACOB, G. S.; DAVISSON, V. J.; DOTSON, S. B. Virulence of a Phosphoribosylaminoimidazole Carboxylase-Deficient *Candida albicans* Strain in an Immunosuppressed Murine Model of Systemic Candidiasis. **Infection and Immunity**, St. Louis, v. 69, n. 4, p. 2542-2548, 2001.

DUBOVSKIY, I. M.; WHITTEN, M. M. A.; YAROSLAVTSEVA, O. N.; GREIG, C.; KRYUKOV, V. Y.; GRIZANOVA, E. V.; MUKHERJEE, K.; VILCINSKAS, A.; GLUPOV, V. V.; BUTT, T. M. Can insect develop resistance to insect pathogenic fungi? **Plos ONE**, Novosibirsk, v. 8, n. 4, ID. e60248, 2013.

DUNN, C. J.; MATHESON, A.; FAULDS, D. M. Tamsulosin. A review of its pharmacological and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms. **Drugs Aging**, Auckland, v. 19, n. 2, p. 135-161, 2002.

EFIL, L.; EFIL, F.; ATAY, E. New pest *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) in Peanut field. **Journal of Applied Biological Science**, Adana, v. 5, n. 3, p. 65-67, 2011.

EFIL, L.; ÖZGÜR, O.; EFIL, F. A new pest, *Duponchelia fovealis* Zeller, on strawberries in Turkey: damage, distribution and parazitoid. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, Bingöl, v. 2, p. 328-334, 2014

EILENBERG, J. A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biological Control**, Frederiksberg, v. 46, p. 387-400, 2001.

ERUKAINURE, O. L.; AJIBOYE, J. A.; OKAFOR, O. Y.; OKORO, E. E.; ASIEBA, G.; SARUMI, B. B.; ADENEKAN, S. O.; ZARUWA, M. Z. Alcoholic lung injury: pineapple peel extract modulates antioxidant enzymes and attenuates lipid peroxidation in rat models. **Clinical Phytoscience**, Lagos, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2017.

ESCRIVA, H.; SAFI, R.; HÄNNI, C.; LANGLOIS, M.-C.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; STEHELIN, D.; CAPRON, A.; PIERCE, R.; LAUDET, V. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Lilli Cedex, v. 14, n. 13, p. 6803,6808, 1997.

ETHUR, L. Z.; COPATTI, A. S.; FIPKE, G. M.; CALVANO, C. C. A.; PAZINI, J. D. B.; 2014. Parasitic mycoflora of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from soils of the western frontier of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, Itaquí, v. 81, n. 1, p. 62-67, 2014.

FAN, Y.; FANG, W.; GUO, S.; PEI, X.; ZHANG, Y.; XIAO, Y.; LI, D.; LIN, K.; BIDOCHKA, M. J.; PEI, Y. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, Chongqing, v. 73, n. 1, p. 295-302, 2007.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMITIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 109-120, 2011.

FAQUAET, M. *Duponchelia fovealis*, een nieuwe soort voor de Belgische fauna (Lepidoptera: Pyralidae). **Phegea**, Wetteren, v. 28, n. 1, p. 13-14, 2000.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Valencia, v. 47, p. 501-533, 2002.

FOLMER, V.; PEDROSO, N.; MATIAS, A. C.; LOPES, S. C. D. N., ANTUNES, F.; CYRNE, L.; MARINHO, H. S. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces rapid lipid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Lisboa, v. 1778, p. 1141-1147, 2008.

FUENTES, A.; ALMONACID, L.; OCAMPO, J. A.; ARRIAGADA, C. Synergistic interactions between a saprophytic fungal consortium and *Rhizophagus irregularis*

alleviate oxidative stress in plants grown in heavy metal contaminated soil. **Plant Soil**, Temuco, v. 407, p. 355-366, 2016.

FRAGA-CORRAL, M.; CARPENA, M.; GARCIA-OLIVEIRA, P.; PEREIRA, A. G.; PRIETO, M. A.; SIMAL-GANDARA, J. Analytical metabolomics and application in health, environmental and food science. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Bragança, p. 1-23, 2020.

FRANK, S. D.; NAGLE, A. M. Impact of selected insecticides against European pepper moth larvae infesting poinsettia, 2021. **Arthropod Management Tests**, Raleigh, v. 46, n. 1, p. tsab104, 2021.

GAI, Y.; LI, L.; MA, H.; RIELY, B. K.; LIU, B.; LI, H. The critical role of MetR/MetB/MetC/MetX in Cysteine and methionine metabolism, fungal development and virulence of *Alternaria alternata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Hangzhou, v. 87, n. 4, 2021

GALLON, M. E.; SILVA-JUNIOR, E. A.; AMARAL, J. G.; LOPES, N. P.; GOBBONETO, L. Natural products diversity in plant-insect interaction between *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Chlosyne lacinia* (Nymphalidae). **Molecules**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 17, ID. 3118, 2019.

GARSHA, U.; JERNERÉN, F.; CHUNG, D. W.; KELLER, N. P.; HAMBERG, M.; OLIV, E. H. Identification of Dioxygenases required for *Aspergillus* development. **The Journal of Biological Chemistry**, Uppsala, v. 282, n. 48, p. 34707-34718, 2007.

GIBSON, D. M.; DONZELLI, B. G. G.; KRASNOFF, S. B.; KEYHANI, N. O. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural Product Reports**, New York, v. 31, n. 10, p. 1287-1305, 2014.

GONÇALVES, R. B. **Parâmetros biológicos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) em dieta artificial**. 2012, Monografia – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GONÇALVES, R. B.; OLIVEIRA, M. C. H.; BACH, R. P.; PIMENTEL, I. C.; ZAWADNEAK, M. A. C. Estratégias sustentáveis e ambientalmente seguras no controle de *Duponchelia fovealis* sob a ótica da bibliometria. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO, VI, 2021, Lages. **Anais...** Lages: Uniplac, 2021.



GRABIEC, U.; DEHGHANI, F. N-Arachidonoyl Dopamine: A novel endocannabinoid and endovanilloid with widespread physiological and pharmacological activities. **Cannabis and Cannabinoid Research**, Halle, v. 2, n. 1, p. 183-196, 2017.

GUÉDON, E.; MARTIN-VERSTRAETE, I. Cysteine Regulation and its metabolism in Bacteria. In: WENDISCH, V. F. ed. **Amino Acid Biosynthesis~ Pathways, Ragulation and Metabolic Engeneering**. Berlim: Springer. p. 195-218, 2006.

GUPTA, A.; THOMAS, T.; KHAN, S. Physicochemical, Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Aegle marmelos*. **UK Journal of Pharmaceuticals and Biosciences**, Sehore, v. 6, n. 3, p. 17-24, 2018.

GUPTA, S.; DIKSHIT, A. K. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. **Journal of Biopesticides**, New Delhi, v. 3, n. 1, p. 186-188, 2010

GUPTA, R.; SAXENA, R. K.; CHATURVEDL, P.; VIRDI, J. S. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. **Journal of Applied Bacteriology**, New Delhi, v. 76, p. 376-383, 1995.

HAJEK, A. E.; DELALIBERA JR, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **Biological Control**, Ithaca, v. 55, p. 147-158, 2010.

HARITH-FADZILAH, N.; GHANI, I. A.; HASSAN, M. Omics-based approach in characterizing mechanisms of entomopathogenic fungi pathogenicity: A case example of *Beauveria bassiana*. **Journal of King Saud University - Science**, Selangor, v. 33, p. 101332, 2020.

HARTMANN, T.; BILLER, A.; WITTE, L.; ERNST, L.; BOPPRÉ, M. Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). **Biochemical Systematics and Ecology**, Braunschweig, v. 18, n. 7/8, p. 549-554, 1990.

HE, J.-Z.; RU, Q.-M.; DONG, D.-D.; SUN, P.-L. Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water-soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. **Molecules**, Hangzhou, v. 17, n. 4, p. 4373-4387, 2012.

HE, Z.; ZHAO, X.; LU, Z.; WANG, H.; LIU, P.; ZENG, F.; ZHANG, Y. Comparative transcriptome and gene co-expression network analysis reveal genes and signaling pathway adaptively response to varied adverse stress in the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Chongqing, v. 151, p. 169-181, 2018.

HELL, R.; WIRTZ, M. Molecular Biology, Biochemistry and Cellular Physiology of Cysteine metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, Heidelberg, v. 9, 2011.

HERRERA-ESTRELLA, A.; CHET, I. Chitinases in biological control. In: JOLLÉS, P.; MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin and Chitinases**. Irapuato: *EXS-BASEL*, 1999. pp. 171-184.

HISSEN, A. H. T.; WAN, A. N. C.; WARAS, M. L.; PINTO, L. J.; MOORE, M. M. The *Aspergillus fumigatus* siderophore biosynthetic gene *sidA*, encoding L-Ornithine *N*<sup>5</sup>-Oxygenase, is required for virulence. **Infection and Immunity**, Burnaby, v. 73, n9, p. 5493-5503, 2005.

HMDB - THE HUMAN METABOLOME DATABASE. Canadá, 2007-2020.

HOFFMAN, D. E.; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M. E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell and Environment**, Umea, v. 33, n. 8, p. 1298-1313, 2010.

HONDA, K.; ÔMURA, H.; CHACHIN, M.; KAWANO, S.; INOUE, T. A. Synergistic or antagonistic modulation of oviposition response of two swallowtail butterflies, *Papilio maackii* and *P. protenor*, to *Phellodendron amurense* by its constitutive prenylated flavonoid, Phellamurin. **Journal of Chemical Ecology**, Hiroshima, v. 37, p. 575-581, 2011.

HU, J.; WEI, Z.; FRIMAN, V.-P.; GU, S.-H.; WANG, X.-F.; EISENHAUER, N.; YANG, T.-J.; MA, J.; SHEN, Q.-R.; XU, Y.-C.; JOUSSET, A. Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression. **MBio**, Nanjing, v. 7, n. 6, ID. e01790-16, 2016.

HUANG, W.-Y.; CAI, Y.-Z.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. **Economic Botany**, Hong Kong, v. 61, n. 1, p. 14-30, 2006.

HUNG, T. M.; NA, M.K.; THUONG, P. T.; SU, N. D.; SOK, D.S.; SEONG, Y. H.; BAE, K.H. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. **Journal of Ethnopharmacology**, Daejeon, v. 108, p. 188-192, 2006.

HUSSAIN, A. N.; ABBASI, S.; SHARIFI, R.; JAMALI, S. The effect of biocontrol agents consortia against *Rhizoctonia* root rot of common bean *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Crop Protection**, Kermanshah, v. 7, n. 1, p. 73-85, 2018.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop protection**, v. 19, n. 8, p.603-608, 2000.

JATAV, S.; DWIVEDI, P.; SINGH, M.; SEHRA, N.; MISHRA, B. B. Properties and important molecules of medicinal interest in wood apple (*Aegle marmelos*). In. TEWARI, A.; TIWARI, S. (Ed.). **Synthesis of Medicinal Agents from Plants**. Amsterdam: Elsevier, 2018, p. 127-150.

JONSSON, P.; JOHANSSON, A. I.; GULLBERG, J.; TRYGG, J.; JIYE, A.; GRUNG, B.; MARKLUND, S.; SJÖRSTRÖM, M.; ANTTI, H.; MORITZ, T. High-Throughput Data Analysis for Detecting and Identifying Differences between Samples in GC/MS-Based Metabolomic Analyses. **Analytical Chemistry**, Umea, v. 77, n. 17, p. 5635-5642, 2005.

JORDAN, A.; MENZL, J.; PODOLSKY, T. C.; MANZO, E.; ESTES, P. S.; ASHFORD, S.; ZARNESCU, D. C. PPAR gamma activation is neuroprotective in a Drosophila model of ALS based on TDP-43. **Human Molecular Genetics**, Tucson, v. 24, n. 6, p. 1741-1754, 2015.

KAFER, C.; ZHOU, L.; SANTOSO, D.; GUIRGIS, A.; WEERS, B.; PARK, S.; THORNBURG, R. Regulation of pyrimidine metabolism in plants. **Frontiers in Bioscience**, Ames, v. 9, p. 1161-1125, 2004.

KANG, B. R.; HAN, J. H.; KIM, J. J.; KIM, Y. C. Dual biocontrol potential of the entomopathogenic fungus, *Isaria javanica*, for both aphids and plant fungal pathogens. **Mycobiology**, Gwangju, v. 46, n. 4, p. 440-447, 2018.

KAVKOVÁ, M.; ČURN, V. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). **Mycopathologia**, České Budekovic, v. 159, p. 53–63, 2005.

KAWSAR, S. M. A.; ISLAM, M.; JESMIN, S.; MANCHUR, M. A.; HASAM, I.; RAJIA, S. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxic effect of some uridine derivatives. **International Journal of Bioscience**, Chittagong, v. 12, n. 6, p. 211-219, 2018.

KHACHATOURIANS, G. G.; QAZI, S. S. Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and Molecular Biology. In: BRAKHAGE, A. A.; ZIPFEL, P. F. (Eds.). **Human and Animal Relationships: The Mycota VI**. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag, 2008. p. 33-61.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; MOLLOY, M. P.; NEVALAINEN, H. K. M. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity in 2D gel. **Protein Expression Purification**, North Ryde, v. 32, p. 210-220, 2003.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, North Ryde, v. 31, p. 346-352, 2004.

KEGG PATHWAY DATABASE – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.  
Disponível em: < <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> > Consultado em: 02 Mai 2021

KELLER, N. P. Fungal Secondary Metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, Wisconsin, v. 17, p. 167-180, 2019.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, Wisconsin, v. 3, n. 12, p. 937-947, 2005.

KERWIN, J. L.; TUININGA, A. R.; ERICSSON, L. H. Identification of molecule species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, Seattle, v. 35, p. 1102-1114, 1994.

KEYHANI, N. O. Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi. **Fungal Biology**, Gainesville, v. 122, p. 420-429, 2018.

KING-JONES, K.; THUMMEL, C. S. Nuclear Receptors: A perspective from *Drosophila*. **Nature Reviews Genetics**, Salt Lake City, v. 6, n. 4, p. 311-323, 2005.

KLEINER, A. A. P.; FERREIRA, A.; LIMA, A. O. S.; ANDREOTE, F. D.; PIMENTEL I. C.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; QUECINE, M. C.; MARTINS M. K.; LACAVALA, P. T.; ROSSETO, P. B.; STUART, R. M.; ARAUJO, W. L. **Guia prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba: Calo, 2010.

KRAUSS, U.; BIDWELL, R.; INCE, J. Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of crown rot of banana. **Biological Control**, Santa Lucia, v. 13, n. 2, p.111-119, 1998.

KRAUSS, U.; HIDALGO, E.; ARROYO, C.; PIPER, S. R. Interaction between entomopathogenic *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the mycoparasites *Clonostachys* spp., *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. **Biocontrol Science and Technology**, Turrialba, v. 14, n. 4, p. 331-346, 2004.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of Flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, Allahabad, v. 2013, ID. 162750, 2013.

LAWTON, S. K. **Immune regulation by the endocannabinoid N-Arachidonoyl dopamine (NADA)**. 2017. 228 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of California San Francisco, California, 2017. Disponível em:<<https://escholarship.org/uc/item/7wj3d52v>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

LEOPOLD, J.; SAMSINÁKOVÁ, A. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Prague, v. 15, p. 34-42, 1970.

LEVINE, R. L.; HOOGENRAD, N. J.; KRETCHMER, N. A review: Biological and clinical aspects of pyrimidine metabolism. **Pediatric Research**, Standford, v. 8, n. 7, 1974.

LEVINE, R. L.; MORONI, L.; BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Maryland, v. 93, n. 26, p. 15036-15040, 1996.

LEVONEN, A.-L.; DICKINSON, D. A.; MOELLERING, D. R.; MULKAHY, R. T.; FORMAN, H. J.; DARLEY-USMAR, V. M. Biphasic effects of 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. **Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology**, Birmingham, v. 21, n. 11, p. 1846-1851, 2001.

LIARZI, O.; BAR, E.; LEWINSOHN, E.; EZRA, D. Use of endophytic fungus *Daldinia cf. concentrica* and its volatiles as bio-control agents. **PLoS ONE**, Rishon LeZion, v. 11, n. 12, p. e0168242, 2016.

LIND, U.; ROSENBLAD, M. A.; FRANK, L. H.; FALKBRING, S.; BRIVE, L.; LAURILA, J. M.; POHJANOKSA, K.; VUORENPÄÄ, A.; KUKKONEN, J. P.; GUNNARSSON, L.; SCHEININ, M.; LINDBLAD, L. G. E. M.; BLOMBERG, A. Octopamine receptors from the barnacle *Balanus improvisus* are activated by the  $\alpha$ -adrenoceptor agonist Medetomidine. **Molecular Pharmacology**, Gothenburg, v. 78, n. 2, p. 237-248, 2010.

LIPID WEB. Disponível em: < <https://www.lipidhome.co.uk/>>. Acesso em: 10 mai. 2020.

LIU, Y.-Q.; DAI, W.; TIAN, J.; YANG, L.; FENG, G.; ZHOU, X.-W.; KOU, L.; ZHAO, Y.-L.; LI, W.-Q.; LI, L.-H.; LI, H.-Y. Synthesis and insecticidal activities of novel spin-labeled derivatives of camptothecin. **Heteroatom Chemistry**, Lanzhou, v. 22, n. 6, p. 687-691, 2011

LOU, S.; LEVINE, R. L. Methionine in proteins defends against oxidative stress. **The FASEB Journal**, Maryland, v. 23, n. 2, p. 464-472, 2009.

LU, H. -L.; ST. LEGER, R. J. Insect immunity to entomopathogenic fungi. **Advances in Genetics**, Maryland, v. 94, p. 251-285, Academic Press, 2016.

LUO, F.; WANG, Q.; YIN, C.; GE, Y.; HU, F.; HUANG, B.; ZHOU, H.; BAO, G.; WANG, B.; LU, R.; LI, Z. Differential metabolic responses of *Beauveria bassiana* cultured in pupae extracts, root exudates and its interactions with insect and plant. **Journal of Invertebrate Pathology**, Hefei, v. 130, p. 154-164, 2015.

LUQUE, E. M.; GUTIÉRREZ, G.; NAVARRO-SAMPEDRO, L.; OLMEDO, M.; RODRÍGUEZ-ROMERO, J.; RUGER-HERREROS, C.; TAGUA, V. G.; CORROCHANO. A relationship between carotenoid accumulation and the distribution of species of the fungus *Neurospora* in Spain. **Plos ONE**, Sevilla, v. 7, n. 3, ID. e33658, 2012.

MA, J.; TONG, S.; WANG, P.; LIAO, W.; LIU, H.; ZHANG, L. Insecticidal activity of camptothecin against *Nilaparvata lugens*, *Brevicoryne brassicae* and *Chilo suppressalis*. **Journal of Economic Entomology**, Lian-an, v. 103, n. 2, p. 492-496, 2010.

MADAIL, J. C. M. Panorama econômico. pp 15-33. IN: ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, J.; SCHWENGBER, J. E. (Editores Técnicos). **Morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 589 p.

MAOKA, T.; ETOH, T.; BRODINA, A. V.; SOLDATOV, A. A. A series of 19'-Hexanoyloxyfucoxanthin derivatives from the Sea Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Growth in the black sea, Ukraine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Kyoto, v. 59, p. 13059-13064, 2011.

MAOWA, J.; ALAM, A.; RANA, K. M.; DEY, S.; HOSEN, A.; FUJII, Y.; HASAN, I.; OZEKI, Y.; KAWSAR, S. M. A. Synthesis, characterization, synergistic antimicrobial properties and molecular docking of sugar modified uridine derivatives. **Sciendo**, Chittagong, v. 3, n. 1, p. 6-21, 2021.

MATSUMAE, H.; FURUI, M.; SHIBATANI, T. Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-Phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 75, n. 2, p. 93-98, 1993.

MEENA, M.; PRASAD, V.; ZEHRA, A.; GUPTA, V. K.; UPADHYAY, R. S. Mannitol metabolism during pathogenic fungal-host interactions under stressed conditions. **Frontiers in Microbiology**, Varanasi, v. 6, 2015

MENDE, K.; HOMANN, V.; TUDZINSKI, B. The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and expression. **Molecular and General Genetics**, Münster, v. 255, p. 96-105, 1997.

MESSELINK, G.; WENSWEEN, W. V. Biocontrol of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Pyralidae) with soil-dwelling predators in potted plants. **Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences**, Naaldwijk, v. 68, n. 4Pt. A, p. 159-165, 2003.

MEY, B. V.; BETHKE, J. A. Efficacy of selected insecticides against the European pepper moth, *Duponchelia fovealis*, on verbena grown outdoors, 2010. **Arthropod Management Tests**, San Diego, v. 36, n. 1, p. G. 22, 2011.

MISHRA, A.; MALIK, A. Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. **Bioresource Technology**, New Delhi, v. 171, p. 217-226, 2016.

MURPHY, B. R.; DOOHAN, F. M.; HODKINSON, T. R. Matching source and sink: An environmentally tailored fungal endophyte consortium increases yield in three field-grown barley cultivars. **Cogent Food & Agriculture**, Dublin, v. 4, ID. 1484599, 2018.

MYERS, J. H.; CORY, J. S. **Biological Control Agents: Invasive Species or Valuable Solutions?** In: Impact of Biological Invasions on Ecosystem Services. Springer International Publishing, p. 191-202. 2017.

MYLLYMÄKI, H.; RÄMET, M. JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. **Scandinavian Journal of Immunology**, Tampere, v. 79, n. 6, p. 377-385, 2014.

NAVEEDA S. **Microbial consortium for the management of insect pest of bitter gourd (*Momordica charantia* L.)**. Tese (Doutorado em Agricultura) - Department of Agricultural Entomology College of Agriculture, Vellayani - Thiruvananthapuram. 2018.

NAZ, S.; SANTOS, D. C. M.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Analytical protocols based on LC-MS, GC\_MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. **Bioanalysis**, Madrid, v. 6, n. 12, p. 1657-1677, 2014.

NICOLAESCU, O.; VARUT, R.-M.; PATRUNA, S. Determination of the polyphenolic content of *Dorycnium herbaceum* plant extract and testing *in vivo* antioxidant effect, comparative with Bilberry. **Revista de Chimie**, Craiova, v. 70, n. 2, p. 667-670, 2019.

NICHOLAS, D. A.; ZHANG, K.; HUNG, C.; GLASGOW, S.; ARUNI, A. W.; UNTERNAEHRER, J.; PAYNE, K. J.; LANGRIDGE, W. H. R.; DE LEON, M. Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cells secretion of IL-1 $\beta$ . **Plos One**, Loma Linda, v. 12, n. 5, 2017.

NISHIDA, R.; BOWERS, W. S.; EVANS, P. H. Synthetic of highly active juvenile hormone analogs, Juvocimene I and II, from the oil of sweet basil, *Ocimum basilicum* L. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 10, n. 10, p. 1435-1451, 1984.

NOVERR, M. C.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. **Infection and Immunity**, Michigan, v. 70, n. 1, p. 400-402, 2002.

NUMATA, A.; IBUKA, T. Alkaloids from ants and other insects. In: BROSSI, A. (Ed.). **The Alkaloids: chemistry and pharmacology**, v. 31. Amsterdam: Academic Press, p. 193-315, 1987.

OLOMBRADA, M.; MEDINA, P.; BUDIA, F.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, Á.; GARCÍA-ORTEGA, L. Characterization of a new toxin from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: the ribotoxin anisoplin. **Biological Chemistry**, Madrid, v. 398, n. 1, p. 135-142, 2017.



ORMROD, D.; SPENCER, C. M. Topotecan. **Drugs**, Auckland, v. 58, n. 3, p. 533-551, 1999.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus insect cuticle. **Insects**, Gainesville, v. 4, n. 3, p. 357-374, 2013.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Molecular genetics of *Beauveria bassiana* infection of insects. **Advances in Genetics**, Gainesville, v. 94, p. 165-249, 2016.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi. **Current Genetics**, Gainesville, v. 61, n. 3, p. 239-249, 2015.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Morango: Uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Journal of Chromatographic Science**, Campinas, v. 4, n. 1, p. 52-76, 2012.

PAES, J. P. P.; LIMA, V. L. S.; CARVALHO, J. R.; PRATISSOLI, D. Functional responses of two egg parasitoids of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) genre on *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) eggs. **Journal of Experimental Agriculture International**, Canoinhas, v. 20, n. 6, p. 1-7, 2018b.

PAES, J. P. P.; LIMA, V. L. S.; PRATISSOLI, D.; CARVALHO, J. R.; BUENO, R. C. O. F. Selection of parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and parasitism at different egg ages of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Canoinhas, v. 40, p. e-42216-s42216, 2018a.

PAES, J. P. P.; LIMA, V. L. S.; PRATISSOLI, D.; CARVALHO, J. R.; PIROVANI, V. D.; BUENO, R. C. O. F. Thermal requirements, development and number of generations of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Canoinhas, v. 90, n. 2, p. 2447-2457, 2018.

PAL, S.; ST LEGER, R. J.; WU, L. P. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the Innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 282, n. 12, p. 8969-8977, 2007.

PARANÁ - SEAB. Secretaria de Agricultura e do Abastecimento. **Produção de Morango se destaca na região de Curitiba e cresce no Paraná. 2021**. Disponível em < <https://www.agricultura.pr.gov.br/Noticia/Producao-de-morango-se-destaca-na-regiao-de-Curitiba-e-cresce-no-Parana#>>. Consultado em: Jun de 2021.

PARABÁ - SEAB. Secretaria de Agricultura e do Abastecimento. **DERAL – PROGNÓSTICO FRUTICULTURA - 2019**. Disponível em < <https://www.agricultura.pr.gov.br/Pagina/Fruticultura-48> >. Consultado em: Jun de 2021.

PARANÁ - SESA. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. **Plano de vigilância e atenção à saúde de populações expostas aos agrotóxicos do Estado do Paraná. 2019**. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Saude-e-agrotoxicos>>. Consultado em 07 jun 2021

PARRA, J. R. P. Controle Biológico na agricultura Brasileira. **Entomological Communications**, Piracicaba, v. 1, ec01002, 2019.

PARRA, J. R. P.; JUNIOR, A. C. Applied Biological Control in Brazil: From Laboratory Assays to Field Application. **Journal of Insect Science**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 5, 2019.

PATIL, S.; SARRAF, G.; KHARKWAL, A. C. Panorama of *Metarhizium*: Host interaction and its uses in biocontrol and plant growth promotion. In: **Symbiotic soil microorganisms**. Springer: Cham, 2021, p. 289-318.

PELL, J. K.; HANNAM, J. J.; STEINKRAUS, J. J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, Hertfordshire, v. 55, p. 187–198, 2010.

PELUSO, G.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BRESCIANO, E.; VUOTTO, M. L. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. **Journal of Natural Products**, Napoli, v. 50, n. 5, p. 639-646, 1995.

PERFECT, J. R.; TOFFALETTI, D. L.; RUDE, T. H. The gene encoding Phosphoribosylaminoimidazole Carboxylase (*ADE2*) Is Essential for Growth of *Cryptococcus neoformans* in Cerebrospinal Fluid. **Infection and Immunity**, Durham, v. 61, n. 10, p. 4446-4451, 1993.

PILARSKA, D. K.; SOLTER, L. F.; KERESSELIDZE, M.; LINDE, A.; HOCH, G. Microsporidian infections in *Lymantria dispar* larvae: Interactions and effects of multiple species infections on pathogen horizontal transmissions. **Journal of Invertebrate Pathology**, Sofia, v. 93, n. 2, p. 103-113, 2016.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R. M.; AZEVEDO, J. L. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environment conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 5, p. 705-711, 2006.

PIROVANI, V. D. **Método de manejo para *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) na cultura do morangueiro**. 113f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

PIROVANI, V. D.; PRATISSOLI, D.; TIBÚRCIO, M. O.; CARVALHO, J. R.; DAMASCENA, A. P.; FARIA, L. V. Trichogramma galloi and Trichogramma pretiosum for the management of Duponchelia fovealis (Lepidoptera: Crambidae) in strawberry plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Alegre, v. 52, n. 8, p. 690-693, 2017.

POITEVIN, G.C.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, Curitiba, v. 53(3), p. 323-331, 2018.

PU, X.; QU, X. CHEN, F.; BAO, J. ZHANG, G.; LUO, Y. Camptothecin-producing endophytic *Trichoderma atroviridae* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. **Applied Microbiology and Technology**, Chengdu, v. 97, p. 9365-9375, 2013.

PULIDO, J. M.; GUERRERO, I. S.; MARTÍNEZ, I. J. M.; VALADEZ, B. C.; GUZMAN, G. C. T.; SOLIS, E. S.; CORONA, J. F. G.; SCHRANK, A.; BREMONT, F. J.; HERNANDEZ, A. G. Isolation, characterization and expression analysis of the ornithine decarboxylase gene (*ODC1*) of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Microbiological Research**, Guanajuato, v. 166, p. 494-507, 2011.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. Na endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, Dortmund, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, Shanghai, v. 83, p. 96-103, 2018.

QUESADA-MORAGA, E.; CARRASCO-DÍAZ, J.A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, Cordoba, v. 130, n. 8, p. 442-452, 2006

REDDY, C. A.; SARAVANAN, R. S. Polymicrobial multi-functional approach for enhancement of crop productivity. **Advances in Applied Microbiology**, Michigan, v. 82, p. 53-113, Academic Press, 2013

REGIANI, T.; BUDZINSKI, I.; GONZALES, S. G.; LABATE, M. T. V.; CONTINGUIBA, F.; MARQUES, F. G.; MORAES, F. E.; LABATE, C. A. Eletroforese, Cromatografia e espectrometria de massas. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Ed). **Ômica 360°**. Viçosa: Suprema, 2013, p. 124-152.

REHMAN, S.; SHAWL, A. S.; KOUR, A.; ANDRABI, R.; SUDAN, P.; SULTAN, P.; VERMA, V.; QAZI, G. N. An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Sinagar, v. 44, n. 2, p. 203-209, 2008.

RHOME, R.; POETA, M. DEL. Lipid signaling in pathogenic fungi. **Annual Review of Microbiology**, South Carolina, v. 63, p. 119-131, 2009.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Journal of General Microbiology**, Denver, v. 134, p.169-176, 1988.

RODRIGUES, R.; JARAS, L. I.; POLTRONIERI, A. S.; PIMENTEL, I. C.; ZAWADNEAK, M. A. C. Seletividade de inseticidas reguladores de crescimento e botânico no parasitismo de três espécies de *Trichogramma* em ovo de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Entomobrasilis**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 26-32, 2017.

RODRIGUEZ-SUAREZ, R.; XU, D.; VEILLETTE, K.; DAVISON, J.; SILLAOTS, S.; KAUFFMAN, S.; HU, W.; BOWMAN, J.; MARTEL, N.; TROSOK, S.; WANG, H.; ZHANG, L.; HUANG, L.-Y.; LI, Y.; RAHKHOODAEI, F.; RANSOM, T.; GAUVIN, D.; DOUGLAS, C.; YOUNGMAN, P.; BECKER, J.; JIANG, B.; ROEMER, T. Mechanism-of-Action Determination of GMP Synthase Inhibitors and Target Validation in *Candida*

*albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Chemistry and Biology**, Quebec, v. 14, n. 10, p. 1163-1175, 2007

ROTARU, L. T.; VARUT, R. M.; COVEI, M. B.; COSTACHE, I. I.; NOVAC, M.; NICOLAESCU, O.; FLORESCU, C.; PETRICA, A.; KOSTICI, R.; CIOBANU, D. Determination of antioxidant components and activity of *Tamarix ramosissima* comparative with *Vaccinium myrtillus* on Streptozotocin-diabetic mice. **Revista de Chimie**, Craiova, v. 69, n. 7, p. 1860-1865, 2018.

RUDGE, S. A.; SCIORRA, V. A.; IWAMOTO, M.; ZHOU, C.; STRAHL, T.; MORRIS, A. J.; THORNER, J.; ENGBRECHT, J. Roles of Phosphoinositides and Spo14p (phospholipase D)-generated Phosphatidic acid during yeast sporulation. **Molecular Biology of the Cell**, San Diego, v. 15, p. 207-218, 2004.

RUSCH, A.; BOMMARCO, R.; EKBOM, B. Conservation Biological Control in Agricultural Landscapes. **Advances in Botanical Research**, Villenave d'Ornon, v. 81, p. 333-360, 2017.

RUTHERFORD, C.; SPEIRS, C.; WILLIAMS, J. J. L.; EWART, M.-A.; MANCINI, S. J.; HAWLY, S. A.; DELLES, C.; VIOLLET, B.; COSTA-PEREIRA, A. P.; BAILLIE, J. S.; SALT, I. P.; PALMER, T. M. Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signaling. **Science Signaling**, Glasgow, v. 9, p. 453, ra109, 2016.

SAG, D.; CARLING, D.; STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype. **The Journal of Immunology**, Louisville, v. 181, n. 12, p. 8633-8641, 2008

SAHA, S.; WALIA, S.; KUMAR, J.; DHINGRA, S.; PARMAR, B. S. Screening for feeding deterrent and insect growth regulatory activity of triterpenic acid saponins from *Diploknema butyracea* and *Sapindus mukorossi*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Uttarakhand, v. 58, p. 434-440, 2010.

SAKAI, K.; YOKOTA, A.; KUROKAWA, H.; WAKAYAMA, M.; MORIGUCHI, M. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. **Applied and Environmental Microbiology**, Oita, v. 64, n. 9, p. 3397-3402, 1998

SALEEM, A.-R.; IBRAHIM, R. A. Assessment of the virulence and proteolytic activity of three native entomopathogenic fungi against the larvae of *Oryctes Agamemnon*

(Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, Almunawarah, v. 29, n. 1, p. 1-8, 2019

SALOMÃO, K. P. O. S. **Extratos vegetais e *Bacillus thuringiensis* visando o manejo de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae)**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.

SANJAY, K. R. Characterization of *Aspergillus carbonarius* mutant in relation to xanthin production, toxicity studies and fermentation conditions for pigment production. 2009. 179 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of Mysore, India, 2009. Disponível em: < <http://ir.cftri.com/9954/1/Sanjay.pdf> >. Acesso em: 27. Jan. 2021.

SANNAZZARO, A. I.; ÁLVAREZ, C. L.; MENÉNDEZ, A. B.; PIECKENSTAIN, F. L.; ALBERTÓ, E. O.; RUIZ, O. A. Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. **FEMS Microbiology Letters**, Buenos Aires, v. 230, p. 115-121, 2004.

SANTHANAM, R.; LUU, T. V.; WEINHOLD, A.; GOLDBERG, J.; OH, Y.; BALDWIN, I. T. Native root-associated bacteria rescue a plant from sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. **Proceedings of National Academy of Sciences PLUS**, Jena, v. 112, n. 36, p. 5013-5020, 2015.

SANTHANAM, R.; MENEZES, R. C.; GRABE, V.; LI, D.; BALDWIN, I. T.; GROTEN, K. A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. **Molecular Ecology**, Jena, v. 28, n. 5, p. 1154-1169, 2019.

SANTOS, F. M. **Toxicidade de inseticidas para *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae) e potencial parasitismo por *Cortesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae)**. 61f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, 2014.

SANTOS, F. M.; CARVALHO, J. R.; PRATISSOLI, D.; BUENO, R. C. O. F.; PIROVANI, V. D.; RODRIGUES, H. S. Toxicity of insecticides in *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a new strawberry pest in Brazil under laboratory conditions. **Journal of Experimental Agriculture International**, Recife, v. 35, n. 5, p. 1-7, 2019.

SARAVANAKUMAR, K.; YU, C.; DOU, K.; WANG, M.; LI, Y.; CHEN, J. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading

enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum. **Biological Control**, Shanghai, v. 94, p. 37-46, 2016

SARMA, B. K.; YADAV, S. K.; SINGH, S.; SINGH, H. B. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. **Soil Biology and Biochemistry**, Varanasi, v. 87, p. 25-33, 2015.

SCHAEFFLER, A.; GROSS, P.; BUETTNER, R.; BOLLHEIMER, C.; BUECHLER, C.; NEUMAIER, M. KOPP, A.; SCHOELMERICH, J.; FALK, W. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor 4/nuclear factor- $\kappa$ B pathway in adipocytes links nutritional signaling with innate immunity. **Immunology**, Regensburg, v. 126, n. 2, 2009.

SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. 15d-PGJ2: The anti-inflammatory prostaglandin? **Clinical Immunology**, New York, v. 114, p. 100-109, 2005.

SHARMA, C. K.; VISHNOI, V. K.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mug bean. **Rhizosphere**, Haridwar, v. 5, p. 71-75, 2018.

SHIRASUNA, K.; TAKANO, H.; SENO, K.; OHTSU, A.; KARASAWA, T.; TAKAHASHI, M.; OHKUCHI, A.; SUZUKI, H.; MATSUBARA, S.; IWATA, H.; KUWAYAMA, T. Palmitic acid induces interleukin-1 $\beta$  secretion via NLRP3 inflammasomes and inflammatory responses through ROS production in human placental cells. **Journal of Reproductive Immunology**, Kanagawa, v. 116, p. 104-112, 2016.

SILVA, V. C. A.; BARROS, R.; MARQUES, J. E.; TORRES, J. B. Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**, Recife, v. 32, n. 4, p. 653–658, 2003.

SILVERMAN, N.; MANIATIS, T. NF- $\kappa$ B signaling pathway in mammalian and insect innate immunity. **Genes and Development**, Massachusetts, v. 15, p. 2321-2342, 2001

SINGH, B.; KAUR, A. Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review. **LWT Food Science and Technology**, Punjab, v. 87, p. 93-101, 2018.

SINGKARAVANIT, S.; KINOSHITA, H.; IHARA, F.; NIHIRA, T. Geranylgeranyl diphosphate synthase genes in entomopathogenic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Osaka, v. 85, p. 1463-1472, 2010a.

SINGKARAVANIT, S.; KINOSHITA, H.; IHARA, F.; NIHIRA, T. Cloning and functional analysis of the second geranylgeranyl diphosphate synthase gene influencing helvolic acid biosynthesis in *Metarhizium anisopliae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Osaka, v. 87, p. 1077-1088, 2010b

SOLOMON, P. S.; WATERS, O. D. C.; JÖRGENS, C. I.; LOWE, R. G. T.; RECHBERGEN, J.; TRENGOVE, R. D.; OLIVER, R. P. Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch). **Biochemical Journal**, Perth, v. 399, n. 2, p. 231-239, 2006.

SOLTER, L. F.; SIEGEL, J. P.; PILARSKA, D. K.; HIGGS, M. C. The impact of mixed infection of three species of microsporidia isolated from the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Urbana, v. 81, n. 2, p. 103-113, 2002.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Porto Alegre, v. 90, p. 135-143, 2004

SOUZA, M. T.; ZAWADNEAK, M. A. C. Monitorando e aprendendo o manejo das pragas do morangueiro. **Campo & Negócios Hortifruti**, v. 05, p. 58-61, 2018.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, Düsserdorf, v. 24, p. 345-351, 2003.

STOCKS, S.D.; HODGES, A. **European pepper moth or Southern European marsh pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller), 2012**. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN91000.pdf>> Consultado em: 14 jun de 2021.

STRAUS, D. S.; PASCUAL, G.; LI, M.; WELCH, J. S.; RICOTE, M.; HSIANG, C. -H.; SENGCHANTHALANGSY, L. L.; GHOSH, G.; GLASS, C. K. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> inhibits multiple steps in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, Riverside, v. 97, n. 9, p. 4844-4849, 2000

STUART, A. K. C.; FURUIE, J. L.; ZAWADNEAK, M. A. C.; PIMENTEL, I. C. Increased mortality of the European Pepper Moth *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera:



Crambidae) using entomopathogenic fungi consortia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Curitiba, v. 177, p.107503, 2020.

SUN, M. H.; LIU, X. Z. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic hyphomycetes as fungal biocontrol agents. **Mycopathologia**, Beijing, v. 161, n. 5, p. 295-305, 2006.

SUN, H.-H.; MAO, W.-J.; CHEN, Y.; GUO, S.-D.; LI, H.-Y.; QI, X.-H.; CHEN, Y.-L. XU, J. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23.2. **Carbohydrate Polymers**, Shandong, v. 78, n. 1, p. 117-124, 2009.

SZENTIVÁNYI, O.; VARGA, K.; WYAND, R.; SLATTER, H.; KISS, L. *Paecilomyces farinosus* destroys powdery mildew colonies in detached leaf cultures but not on whole plants. **European Journal of Plant Pathology**, Budapest, v. 115, p. 351–356, 2006.

TAHIR, J.; DIJKWEL, P.  $\beta$ -Substituting alanine synthases: role in cysteine metabolism and abiotic and biotic stress signaling in plants. **Functional Plant Biology**, Palmerston North, v. 43, n. 4, p. 307-323, 2016.

TEATHER R.M., WOOD P.J., 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TILLMANN, A. T.; STRIJBIS, K.; CAMERON, G.; RADMANESHFAR, E.; THIEL, M.; MUNRO, C. A.; MACCALLUM, D. M.; DISTEL, B.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P. Contribution of Fdh3 and Glr1 to Glutathione redox state, stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. **PLoS ONE**, Aberdeen, v. 10, n. 6, e0126940, 2015.

TIMBADIYA, P. N.; MANDAVIA, M. K.; GOLAKIYA, B. A. Phytochemical screening, antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Aegle marmelos* leaf extracts. **International Journal of Chemical Studies**, Gujarat, v. 6, n. 2, p. 3509-3517, 2018.

TRIENENS, M.; ROHLFS, M. Insect-fungus interference competition – The potential role of global secondary metabolite regulation, pathway-specific mycotoxin expression and formation of oxilipins. **Fungal Ecology**, Kiev, v. 5, p. 191-199, 2012.

TRIPATHI, A.K.; UPADHYAY, S.; BHUIYAN, M.; BHATTACHARYA, P.R.A. Review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, New Delhi, v. 1, n. 5, p.52-63, 2009.

TSITSIGIANNIS, D. I.; KELLER, N. P. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. **TRENDS in Microbiology**, Norwich, v. 15, n. 3, p. 109-118, 2007

VALADARES-INGLIS, M. C.; LOPES, R. B.; FARIA, M. R. Controle de atrópodes-praga com fungos entomopatogênicos. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020, p. 201-236.

VALDÉS-SANTIAGO, L.; RUIZ-HERRERA, J. Stress and polyamine metabolism in fungi. **Frontiers in Chemistry**, Irapuato, v. 1, 42, 2014.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2006.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **Biological Control**, Wageningen, v. 57, p. 1-20, 2012.

VANDENDRIESSCHE T.; KEULEMANS J.; GEERAERD A.; NICOLAI B. M.; HERTOEG M. L. A. T. M. Evaluation of fast volatile analysis for detection of *Botrytis cinerea* infections in strawberry. **Food Microbiology**, Leuven, v. 36, n. 1, p. 406-414, 2012.

VILAS-BÔAS, S. G.; BOMBERT, A. K. Análise de metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 9, n. 36, p. 58-69, 2006.

VYLKOWA, S.; LORENZ, M. C. Phagosomal neutralization by the fungal Pathogen *Candida albicans* Induces Macrophage Pyroptosis. **Infection and Immunity**, Houston, v. 85, n. 2, e00832-16, 2017.

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 Regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, Shanghai, v. 282, n. 29, p. 21110-21115, 2007.

WANG, D.; DENG, J.; PEI, Y.; LI, T.; JIN, Z.; LIANG, L.; WANG, W.; LI, L.; DONG, X. Identification and virulence characterization of entomopathogenic fungus *Lecanicillium attenuatum* against pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). **Applied Entomology and Zoology**, Hubei, v. 52, n. 3, p. 511-518, 2017.

WAQUIL, J. M. Manejo Integrado de pragas: revisão histórica e perspectivas. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo [resumos expandidos]. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo; Florianópolis: Epagri, 2002.

WILLIAMS, C. M. A humoral Stimulus to the secretion of the brain-hormone in Lepidoptera. **Nature**, Cambridge, v. 178, p. 213, 1956.

WU, C.-G.; TIAN, J.-L.; LIU, R.; CAO, P.-F.; ZHANG, T.-J.; REN, A.; SHI, L. ZHAO, M. W. Ornithine decarboxylase-mediated production of putrescine influences ganoderic acid biosynthesis by regulation of reactive oxygen species in *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Jiangsu, v. 83, n. 20, e01289-17, 2017.

WU, Q.; SUN, R.; NI, M.; YU, J.; LI, Y.; YU, C.; DOU, K.; REN, J.; CHEN, J. Identification of a novel fungus *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. **PloS ONE**, Shanghai, v. 12, n. 6, ID. e0179957, 2017.

XIAO, G.; YING, S.-H.; ZHENG, P.; WANG, Z.-L.; ZHANG, S.; XIE, X.-Q.; SHANG, Y.; ST. LEGER, R. J.; ZHAO, G.-P.; WANG, C.; FENG, M. C. Genomic perspectives evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific reports**, Shanghai, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2012.

YANG, L.; RU, Y.; CAI, X.; YIN, Z.; LIU, X.; XIAO, Y.; ZHANG, H.; ZHENG, X.; WANG, P.; ZHANG, Z. Molmd4 mediates crosstalk between moPdeH-cAMP signalling and purine metabolism to govern growth and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, Nanjing, v. 20, n. 4, p. 500-518, 2019

YANG, W.; ZHENG, L.; LIU, H.-X.; WANG, K.-B.; YU, Y.-Y.; LUO, Y.-M.; GUO, J.-H. Evaluation of the effectiveness of a consortium of three plant-growth promoting rhizobacteria for biocontrol of cotton *Verticillium*-wilt. **Biocontrol Science and Technology**, Huaian, v. 24, n. 5, p. 489-502, 2014.

YAP, T. A.; GARRETT, M. D.; WALTON, M. I.; RAYNAUD, F.; BONO, J. S.; WORKMAN, P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls and promises. **Current Opinion in Pharmacology**, Sutton, v. 8, p. 393-412, 2008.

YU, W.; WANG, M.; ZHANG, H.; QUAN, Y.; ZHANG, Y. Expression and functional analysis of storage protein 2 in the silkworm *Bombyx mori*. **International Journal of Genomics**, Zhejiang, v. 2013, ID. 145450, 2013.

YUN, S. J.; KIM, H.; JUNG, S.-H.; KIM, J. H.; RYU, J. E.; SINGH, N. J.; JEON, J.; HAN, J.-K.; KIM, C.-H.; KIM S.; JANG, S. K.; KIM, W. J. The mechanistic insights of a specific interaction between 15d-Prostaglandin-J2 and eIF4A suggests an evolutionary conserved role across species. **Biology Open**, Pohang, v. 7, n. 11, 2018.

ZAKER M. Antifungal evaluation of some plant extracts in controlling *Fusarium solani*, the causal agent of potato dry rot *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Agriculture and Biosciences**, Shahrood, v. 3, n. 4, p. 190-195, 2014

ZAWADNEAK, M. A. C.; BOTTON, M.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; VIDAL, H. R.; BERNARDI, D. **Pragas do morangueiro**, in: ZAWADNEAK, M. A. C.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, Á.F. (Eds.), *Como produzir morangos 2ª. ed.* Ed. UFPR, Curitiba, 296p, 2018.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; KUHN, T. A.; ARAUJO, E.; DOLCI, E.; SANTOS, B.; SILVA, C.; BENATTO, A.; VIDAL, H. Novo Desafio. **Cultivar HF** · agosto / setembro, Curitiba, p. 31-32, 2011.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; POLTRONIERI, A. S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A. M.; BOSBA, A. M.; PIMENTEL, I. C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, Curitiba, v. 114, p. 291-294, 2017.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; PIMENTEL, I. C.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B., POLTRONIERI, A. S.; SOLIS, M. A. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, Curitiba, V. 34, n. 3, p. 91-95, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C.; REINHART, V.; DA ROSA, J. M.; DE SOUZA, M. T.; DE SOUZA, M. T. **Manejo integrado de pragas do morangueiro. Caderno de Campo**. CURITIBA: SENAR AR/PR, 124p., 2020.

ZAWADNEAK, M. A. C.; VIDAL H. R.; SANTOS B. **Lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller**. In: Vilela, E. F., R. A Zucchi. (ed). *Pragas Introduzidas no Brasil, insetos e ácaros*, FEALQ, Piracicaba, Brasil, 2015.

ZHANG, C.; WANG, W.; LU, R.; JIN, S.; CHEN, Y.; FAN, M.; HUANG, B.; LI, Z.; HU, F. Metabolic responses of *Beauveria bassiana* to hydrogen peroxide-induced oxidative stress using an LC-MS-based metabolomics approach. **Journal of Invertebrate Pathology**, Hefei, v. 137, p. 1-9, 2016.

ZHANG, H.; JIANG, H.; ZHANG, H.; LIU, J.; HU, X.; CHEN, L. Anti-tumor efficacy of phellamurin in osteosarcoma cells: involvement of the PI3K/AKT/mTOR pathway. **European Journal of Pharmacology**, Kaifeng, v. 858, ID. 172477, 2019.

ZHANG, L.-B.; TANG, L.; YING, S.-H.; FENG, M.-G. Relative roles of glutathione reductase and four glutaredoxins in glutathione redox, antioxidant activity, and iron homeostasis on *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Hangzhou, v. 100, n. 13, p. 5907-5917, 2016.

ZHANG, L.-B.; QIU, T.-T.; GUAN, Y.; HUANG, Z.-H.; YE, X.-Y. Analyses of transcriptomic and metabolomics reveal pathway of vacuolar Sur7 contributed to biocontrol potential of entomopathogenic *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Fuzhou, p. 107564, 2021.

ZHANG, X.-U.; LI, Q.-H.; XU, Z.-D.; DOU, J.-J. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medicine science: a systematic review. **RSC Advances**, v. 10, p. 3092-3104, 2020.

ZHANG, Y.-L.; LI, S.; JIANG, D.-H.; KONG, L.-C.; ZHANG, P.-H.; XU, J.D. Antifungal activity of metabolites produced by a termite-associated *Streptomyces canus* BYB02. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Nanjing, v. 61, p. 1521-1524, 2013.

ZHOU, Y.; WU, C.; SHENG, Q.; JIANG, C.; CHEN, Q.; LV, Z.; YAO, J.; NIE, Z. Lysine acetylation stabilizes SP2 protein in the silkworm *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, Hangzhou, v. 91, p. 56-62, 2016.

ZHU, X.-M.; LI, L.; WU, M.; LIANG, S.; SHI, H.-B.; LIU, X.-H.; LIN, F.-C. Current opinion on autophagy in pathogenicity of fungi. **Virulence**, Hangzhou, v. 10, n. 1, p. 481-489, 2018.

ZHU, Y. P.; BROWN, J. R.; SAG, D.; ZHANG, L.; SUTTLES, J. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Regulates IL-10-Mediated Anti-

Inflammatory Signaling Pathways in Macrophages. **The Journal of Immunology**, Louisville, v. 194, n. 2, p. 584-594, 2015.

ZIPPER, L.; JASSMANN, D.; BURGMEYER, S.; GÖRLICH, B.; REIFF, T. Ecdysone steroid hormone remote controls intestinal stem cell fate decision via the PPAR $\gamma$ -homolog *Eip75B* in *Drosophila*. **Elife**, Düsseldorf, v. 9, p. e55795, 2020.

ZOU, H.; LI, L.; ZHANG, T.; SHI, M.; ZHANG, N.; HUANG, J.; XIAN, M. Biosynthesis and biotechnological application of non-canonical amino acids: complex and unclear. **Biotechnology Advances**, Qingdao, v. 36, n. 7, p. 1917-1927, 2018.