

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**LEONARDO GIRARDI RANSAN**

**CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *PURPUREOCILLIUM*  
PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE SOLO DO ESTADO DO RIO GRANDE  
DO SUL**

**PORTO ALEGRE**

**2021**

**LEONARDO GIRARDI RANSAN**

**CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *PURPUREOCILLIUM*  
PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE SOLO DO ESTADO DO RIO GRANDE  
DO SUL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Habilitação: Biotecnologia molecular

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank  
Co-Orientador: Bsc. Matheus da Silva Camargo

**PORTO ALEGRE**

**2021**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador do meu trabalho de conclusão de curso, Professor Augusto Schrank, pelo apoio, orientação, oportunidade e disposição da estrutura necessária para realização deste projeto.

À professora Marilene Henning Vanstein pela disponibilização de estrutura adicional para realização deste projeto.

Ao amigo e co-orientador, Matheus da Silva Camargo pelo apoio desde a delimitação deste projeto até a escrita, pelas orientações, conselhos e suporte oferecido.

Aos colegas do laboratório 217 do centro de biotecnologia, Nicolau Sbaraini Oliveira, Felipe Geremia, Valdirléia Pinto e Fabio Carrer Andreis pelo auxílio nos experimentos e companheirismo.

A todos os demais colegas e professores dos laboratórios 217, 219 e 220 do centro de biotecnologia pela parceria e apoio.

Aos amigos que fiz na graduação, Rodrigo Rossoni, Júlia Sobiesiaki, Matheus Von Spitzenberger e Matheus Souza, e ao meu melhor amigo Daniel Deitos de Moraes, pela parceria, companheirismo e apoio, que levarei para toda a vida.

Aos meus pais e à minha irmã pelo amor e apoio incondicional à minha jornada e formação acadêmica, pelo carinho e ensinamentos.

## RESUMO

O controle de pragas consiste no manejo de espécies que causam prejuízos à agricultura e/ou oferecem risco à saúde humana. Nos últimos anos o controle biológico, que utiliza organismos vivos para controlar espécies danosas à variadas atividades, desde aquelas de importância agrícola até fitossanitária, vêm ganhando relevância como alternativa ao controle químico tradicional. Dentre os microrganismos, os fungos entomopatogênicos se destacam por apresentar um importante papel no controle natural da população de artrópodes. Fungos do gênero *Purpureocillium* vêm recebendo crescente interesse devido às muitas aplicações biotecnológicas em potencial, dentre elas: indução do crescimento vegetal, atividade nematicida, produção de metabólitos secundários e controle biológico de artrópodes. Idealmente, espécies aplicáveis ao controle biológico de artrópodes devem apresentar, além de alta virulência a seus hospedeiros, elevada tolerância a estresses abióticos, como temperatura e radiação ultravioleta. Um dos principais obstáculos ao uso disseminado das espécies deste gênero consiste na falta de dados sobre o quão resilientes as mesmas são a estresses abióticos, bem como do papel ambiental exercido pelo gênero. Neste sentido, este trabalho tem como objetivos avaliar a virulência e o crescimento em diferentes faixas de temperatura de isolados de *Purpureocillium* spp., derivados de amostras de solo do estado do Rio Grande do Sul. Os isolados, pertencentes à coleção de fungos entomopatogênicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos, foram identificados por análise de estruturas macro e microscópicas, além da análise das sequências de rDNA-ITS. Os resultados obtidos revelaram que a temperatura ideal de crescimento de *Purpureocillium* spp. está na faixa de 28 °C, com crescimento reduzido a 22 °C e 37 °C, observando-se inibição total do crescimento a 12 °C. Os bioensaios realizados, até o presente momento, empregando larvas de *Tenebrio molitor*, mostraram que, majoritariamente, os fungos apresentaram um tempo letal de 50% de 12 dias. As linhagens AS4, AS115, AS224, AS254 e AS259 se mostraram as mais virulentas e, portanto, as mais promissoras, com LT50 de entre 6 e 7 dias. As perspectivas incluem a realização de testes para avaliar a resistência dos isolados a radiação UV. Por fim, a seleção dos isolados com maior potencial controlador biológico para bioensaios contra a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*.

Palavras-chave: controle biológico, *Purpureocillium* spp., estresses abióticos.

## ABSTRACT

Pest control consists of the management of species that cause damage to agriculture and / or pose a risk to human health. In recent years, biological control, which uses living organisms to control species harmful to many activities, ranging from those of agricultural importance to those of phytosanitary relevance, has gained relevance as an alternative to traditional chemical control. Among microorganisms, entomopathogenic fungi are a group of special interest, as they play an important role in the natural control of the arthropod population. Fungi of the genus *Purpureocillium* have been receiving increasing interest due to their many potential biotechnological applications, such as: induction of plant growth, nematocidal activity, production of secondary metabolites and biological control of arthropods. Ideally, species applicable to the biological control of arthropods should present, in addition to high virulence to their hosts, high tolerance to abiotic stresses, such as temperature and ultraviolet radiation. One of the main obstacles to the widespread use of species of this genus is the lack of data on how resilient they are to abiotic stresses as well as the environmental role played by this genus. In this sense, this work aims to evaluate virulence and growth in different temperature ranges, as well as to test the resistance to UV radiation of *Purpureocillium* spp. isolates, derived from soil samples from the state of Rio Grande do Sul. The isolates, which belong to the collection of entomopathogenic fungi of the Laboratory of Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi, were identified by analysis of macro and microscopic structures, in addition to the analysis of the rDNA-ITS sequences. The results obtained reveal that the ideal growth temperature for *Purpureocillium* spp. is in the range of 28 °C, with reduced growth at 22 °C and 37 °C, and with total growth inhibition at 12 °C. The bioassays carried out, so far, using larvae of *Tenebrio molitor*, showed that, mainly, the fungi had an average lethal time of 50% of 12 days. The strains AS4, AS115, AS224, AS254 and AS259 proved to be the most virulent and, therefore, the most promising, with LT50 between 6 and 7 days. Future prospects include conducting tests to assess the resistance of the isolates to UV radiation. Also, to select the isolates with the greatest potential of biological control to be tested on bioassays against the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* larvae.

Keywords: biological control, entomopathogenic fungi, *Purpureocillium* spp., abiotic stressors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O mercado de controle biológico.....	11
Figura 2. Adesão e eventos pré-penetração.....	12
Figura 3. Eventos pós-penetração.....	13
Figura 4. Modelo proposto à evolução dos fungos entomopatogênicos.....	15
Figura 5. Diversidade fúngica.....	16
Figura 6: Comparação do reverso de colônias dos isolados AS94 e AS83.....	22
Figura 7: Fatores ambientais do estado do Rio Grande do Sul.....	24
Figura 8: Ocorrência de fungos entomopatogênicos de acordo com faixas de temperatura.....	25
Figura 9: Quantificação de fungos no banco de isolados do LBCMFF.....	30
Figura 10: Etapas utilizadas na reação de PCR.....	33
Figura 11: Determinação do diâmetro médio de colônia.....	37
Figura 12: Mapa dos pontos de coleta.....	40
Figura 13: Árvore filogenética.....	42
Figura 14: Diâmetros médios de colônias à 28 °C.....	43
Figura 15: Diâmetros médios de colônias à 22 °C.....	44
Figura 16: Diâmetros médios de colônias à 37 °C.....	44
Figura 17: Resultados gerais dos testes de termotolerância.....	45
Figura 18: Gráficos de sobrevivência do primeiro bioensaio .....	46
Figura 19: Gráficos de sobrevivência do segundo bioensaio.....	46
Figura 1.1 – Anexo 1 - Morfologias de colônia.....	61
Figura 2.1 – Anexo 2 - Morfologia macro e microscópica do isolado AS83.....	62

## LISTA DE ABREVIATÓES

FEP – Fungos entomopatogênicos

RS – Rio Grande do Sul

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ITS – Espaçador interno transcrito

TEF - Fator de alongação transcricional

UV – Ultravioleta

BDA – Meio batata dextrose ágar

MCc – Meio Cove completo

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

LB – Luria Bertani (meio de cultivo)

PCR – Reação em cadeia de polimerase

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

SDS – Dodecil sulfato de sódio

M – Molar

RPM – Rotações por minuto

TAE - Tampão tris-ácido-acético-EDTA

LT50 – Tempo letal de 50%

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Controle biológico de pragas.....	9
1.2. Mecanismo de infecção de hospedeiros artrópodes .....	11
1.3. Evolução e diversidade de FEPs .....	13
1.4. Gênero <i>Purpureocillium</i> .....	16
1.5. Caracterização de <i>Purpureocillium lilacinum</i> .....	18
1.6. Potenciais aplicações.....	19
1.6.1. Indução do crescimento vegetal .....	19
1.6.2. Patogenicidade .....	20
1.6.3. Metabólitos secundários .....	21
1.7. Tolerância a estresses abióticos .....	23
1.8. Espécie-alvo de hospedeiro .....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo geral .....	29
3.2. Objetivos específicos .....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
4.1. Isolados e análises morfológicas .....	29
4.2. Preparo das suspensões de esporos .....	31
4.3. Extração de DNA e sequenciamento de região ITS .....	31
4.4. Avaliação do espectro de temperaturas viáveis para o desenvolvimento de colônias dos isolados .....	36
4.5. Bioensaios em <i>Tenebrio molitor</i> .....	37
4.6. Análises estatísticas.....	38
5. RESULTADOS .....	39
5.1. Descrição e ocorrência de <i>Purpureocillium</i> spp. ....	39
5.2. Resultados das análises de ITS.....	41
5.3. Resultados dos testes de termotolerância .....	43
5.4. Resultados dos bioensaios em <i>Tenebrio molitor</i> .....	45
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	50
8. Referências.....	50
ANEXO 1.....	61
ANEXO 2.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Controle biológico de pragas

O controle biológico de pragas consiste na introdução, controlada e proposital, de um organismo (predador, parasita ou patógeno), a fim de diminuir a população de outro organismo alvo, quando o último é prejudicial às atividades humanas, à saúde humana ou ao meio ambiente (Moazami 2019). Atualmente, devido à conscientização sobre os riscos ambientais e à saúde humana decorrentes do uso excessivo de defensivos agrícolas e fertilizantes (Damalas and Eleftherohorinos 2011), a agricultura passa por um processo de transformação (Pandey and Henry 2019). Cada vez mais, são procuradas alternativas para um manejo mais sustentável da agricultura. Nesse contexto, os microrganismos têm ganhado cada vez mais destaque devido ao sucesso de sua aplicação em diversos casos nos anos recentes e aos resultados promissores de pesquisas inovadoras neste campo (Baron, Rigobelo, and Zied 2019). Dentre as mais recentes alternativas estão incluídas não apenas a prospecção de novas espécies (Inglis & Tigano, 2006; Luangsa-Ard et al., 2011; Perdomo et al., 2013; Shin et al., 2017) e a modificação genética de espécies já conhecidas (Thomas and Read 2007).

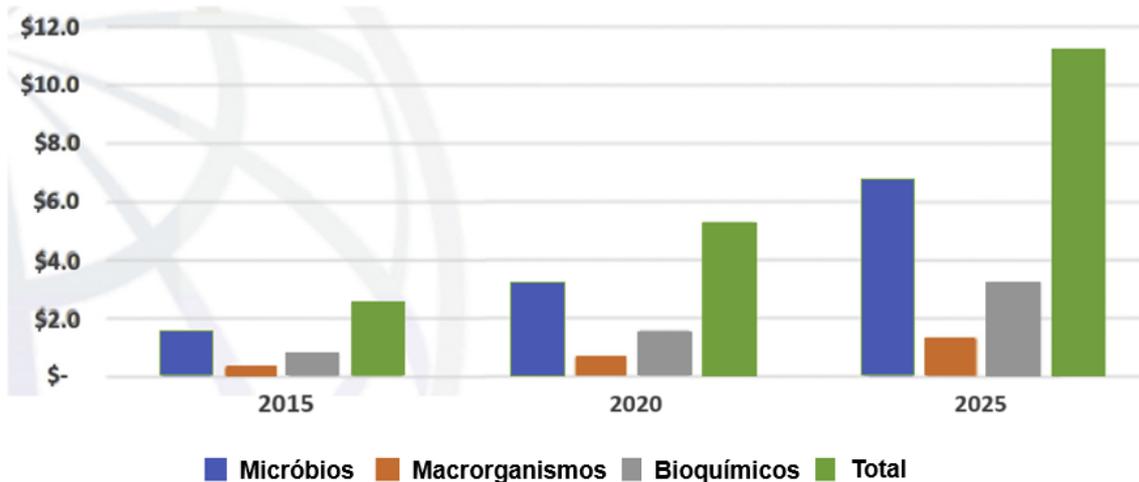
Os microrganismos, além de eficientes no controle de diversas populações de pragas, apresentam vantagens, devido à facilidade de sua produção e aplicação, quando comparados ao uso de animais e plantas (Butt, 2000). É possível usar o organismo propriamente dito como agente de controle biológico ou, em alguns casos, derivados, ou seja, moléculas produzidas pelo organismo, como é o caso da Bassianolida, produzida pelo cluster gênico de mesmo nome em *Lecanicillium lecanii* (Ravindran et al. 2018). Dentre os microrganismos aplicáveis no controle biológico de pragas, os fungos são mais bem estudados e amplamente utilizados. Isso se deve à grande biodiversidade de fungos presentes na natureza, bem como sua eficiência em infectar e matar seus hospedeiros (Butt et al. 2016). O uso de fungos entomopetogênicos no controle biológico de pragas tenderá a crescer ao longo do futuro próximo (Embrapa, 2010) devido às crescentes preocupações do público em relação ao

uso de pesticidas químicos. Somado a isso, há ainda o interesse cada vez maior em estabelecer um manejo da agricultura menos prejudicial ao meio-ambiente, bem como em controlar populações de artrópodes resistentes a defensivos químicos (Whalon, Mota-Sanchez, and Hollingworth 2008). Adicionalmente, biopesticidas fúngicos podem também ser utilizados para controlar populações de outros tipos de organismos além de artrópodes, incluindo plantas daninhas, nematoides, bactérias e fungos fitopatogênicos (Moazami 2019).

O potencial de patógenos fúngicos para o controle de artrópodes-praga começou a ser reconhecido no final do século 19 quando os primeiros isolados do gênero *Metarhizium* spp. foram descritos e testados contra a praga do trigo (*Anisoplia austriaca*) e contra o curculionídeo da beterraba (*Cleonus punctiventris*). Ao longo do último século, houve tentativas de explorar outros gêneros, tais como *Verticillium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, e algumas espécies da ordem Entomophthorales. Dentre os novos gêneros estudados, *Beauveria* e *Trichoderma* ganharam destaque devido à adaptação destes a condições ambientais que *Metarhizium* spp. não toleram e pela capacidade de infectar outras espécies de hospedeiros (Moazami 2019).

Um dos principais obstáculos ao uso mais disseminado de FEPs como agentes de controle biológico é a limitada variedade de espécies estudadas e descritas suficientemente para permitir seu uso em escala comercial (Moazami 2019). Mais de 80% dos biopesticidas fúngicos comercializados atualmente são baseados nos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* (Faria and Wraight 2007). Outras razões do atraso na adoção de estratégias de controle biológico incluem: o laborioso trabalho de isolamento e identificação de potenciais agentes de biocontrole e o desenvolvimento de formulações adequadas para torná-las economicamente viáveis e maximizar a eficiência dos bioprodutos (Schrank and Vainstein 2010).

A Figura 1 mostra as estimativas de crescimento do mercado de controle biológico e seus principais setores, bem como os respectivos valores que deverão atingir no ano de 2025, com base em estimativas feitas em 2019. Percebe-se que todos os setores apresentaram crescimento significativo no período de 2015 a 2020 e que este padrão deverá se manter, no mínimo, a curto prazo (Moazami 2019).

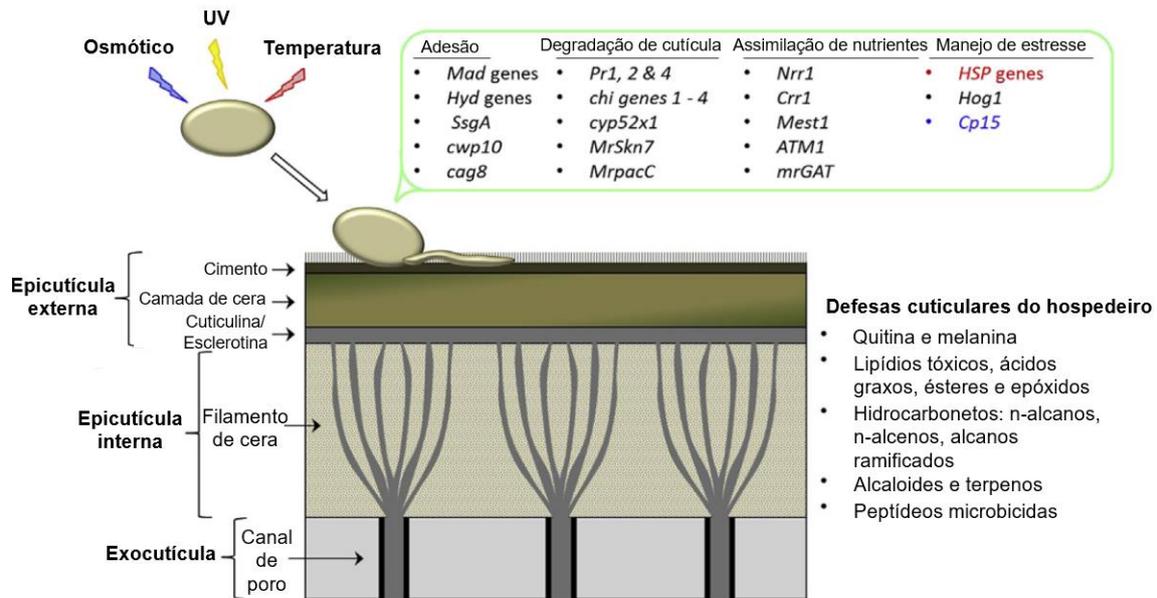


**Figura 1. O mercado de controle biológico.** Principais setores (microrganismos, organismos macroscópicos e produtos bioquímicos) mostram a soma total registrada nos anos de 2015 e 2020, bem como a estimativa para 2025. Valores em bilhões de dólares por ano no mundo (Moazami 2019).

## 1.2. Mecanismo de infecção de hospedeiros artrópodes

O mecanismo de infecção é consideravelmente complexo e varia entre diferentes espécies de FEPs (Butt et al. 2016; Rohlf and Churchill 2011; Toledo-Hernández et al. 2019). Essa complexidade é evidenciada por diferentes mecanismos moleculares de virulência, os quais têm sido evidenciados por análises de genômica comparativa (Gao et al. 2011; Hu et al. 2014). Notavelmente, os processos infecciosos, de diferentes FEPs, apresentam também etapas em comum (Butt 2000). Em geral, tanto os patógenos fúngicos quanto seus hospedeiros artrópodes apresentam significativa plasticidade adaptativa, a qual foi moldada pela coevolução entre estes organismos (Butt et al. 2016).

Dentre as etapas-chave no processo infeccioso de FEPs podemos citar: adesão do esporo, germinação (Figura 2), diferenciação de estruturas especializadas de infecção, penetração, colonização da hemolinfa (Figura 3) e o surgimento de estruturas reprodutivas no cadáver infectado.

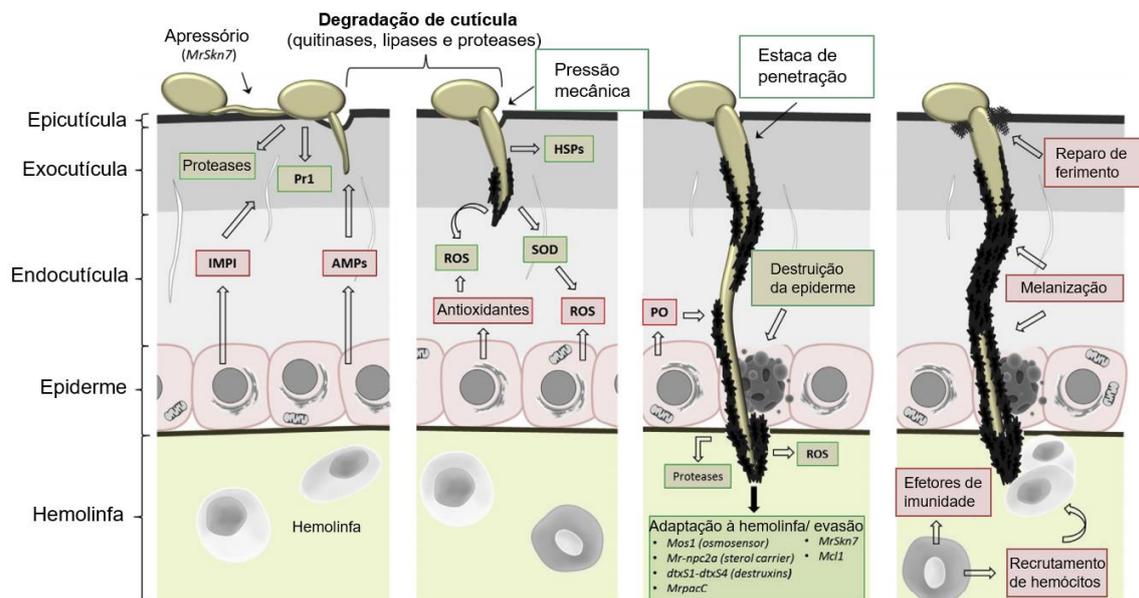


**Figura 2. Adesão e eventos pré-penetração.** Interações entre FEPs, defesas cuticulares do hospedeiro artrópode e fatores ambientais. As estruturas infecciosas dos FEPs estão expostas a uma ampla gama de estressores ambientais (radiação UV, temperatura e compostos antimicrobianos). Dessa forma, mecanismos foram desenvolvidos ao longo da evolução (pigmentos, proteínas de choque térmico e enzimas) para lidar com tais estressores. Adaptado de (Butt et al. 2016).

A aderência à superfície do hospedeiro é essencial à colonização. Dentre os diversos fatores envolvidos na adesão está um grupo de proteínas conhecidas como adesinas, que auxiliam na fixação dos esporos do fungo ao hospedeiro artrópode. Através da construção de mutantes nulos, a função das adesinas foi explorada. Tais mutantes apresentaram uma redução significativa na aderência à cutícula dos artrópodes, o que acarreta em uma severa diminuição na virulência (Wang and St. Leger 2007). As hidrofobinas são outro grupo de importância neste processo. Tais proteínas medeiam interações hidrofóbicas passivas entre estruturas infecciosas e o hospedeiro (Holder and Keyhani 2005).

Pós-adesão, o esporo deve germinar, sendo tal mecanismo governado por pistas moleculares presentes na superfície do hospedeiro (Butt et al. 2016; Rohlf's and Churchill 2011). O processo de penetração da cutícula dos hospedeiros artrópodes pelos FEPs se inicia logo após a adesão/germinação.

Em muitos FEPs uma estrutura especializada de infecção é formada, o apressório. Essa estrutura exerce pressão mecânica e secreta diferentes enzimas hidrolíticas, a fim de romper a cutícula do artrópode atingindo a hemolinfa. Na hemolinfa, os FEPs irão se diferenciar em blastosporos, estruturas unicelulares leveduriformes, que facilitam a dispersão e evasão da resposta imune. Uma vez que a infecção sistêmica foi estabelecida, o patógeno ocasiona a morte do hospedeiro. Em certos casos, a morte pode ser precedida por alterações comportamentais, como por exemplo: pela manipulação do sistema motor do artrópode pelo patógeno (Moazami 2019).



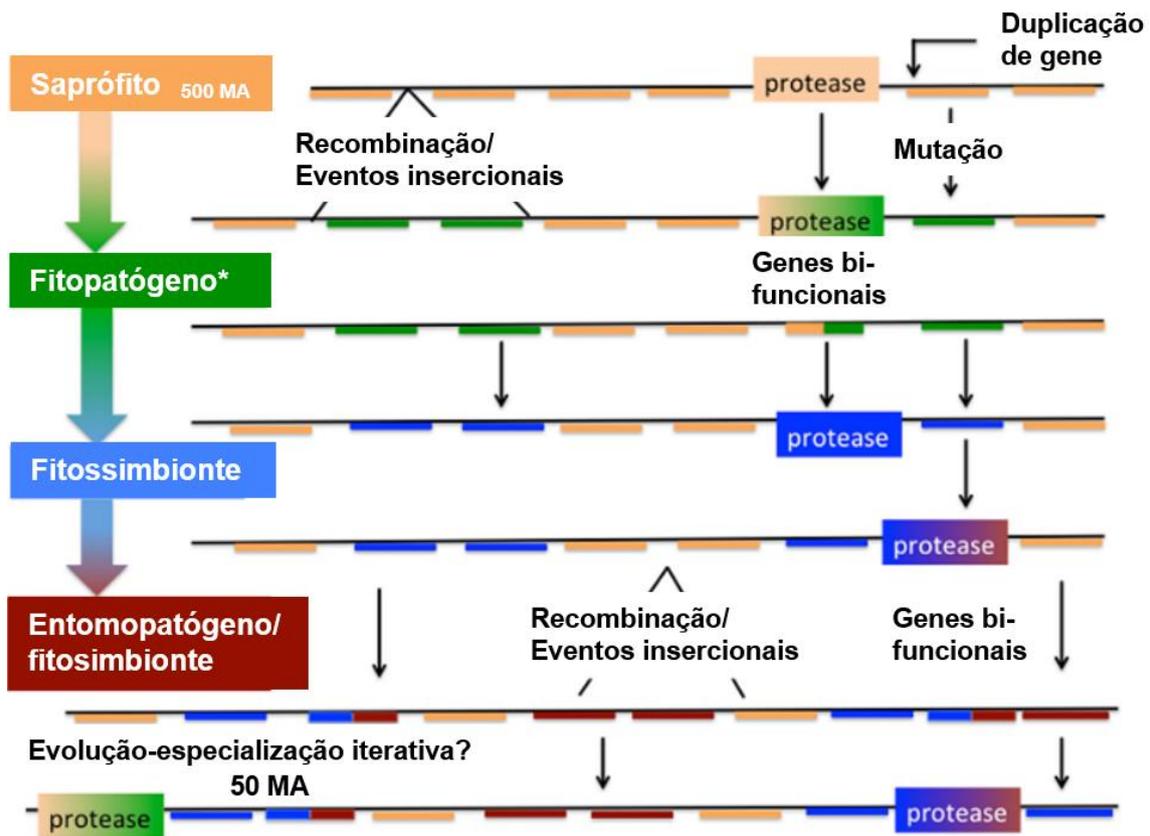
**Figura 3. Eventos pós-penetração.** FEPs produzem um coquetel de enzimas para degradar os componentes da cutícula em conjunto com força mecânica para penetrar o tegumento do inseto. As hifas invasoras são responsáveis por enfrentar as defesas do hospedeiro, sequestrar nutrientes e exibem adaptações fisiológicas e fenotípicas em preparação à expansão do fungo e à evasão do sistema imune. Em antecipação à invasão da hemolinfa, os hemócitos (células de defesa) do inseto são mobilizados para atacar o patógeno. Adaptado de (Butt et al. 2016).

### 1.3. Evolução e diversidade de FEPs

FEPs são encontrados numa grande variedade de ambientes distintos no planeta Terra, sendo capazes de ocupar diversos nichos ecológicos não

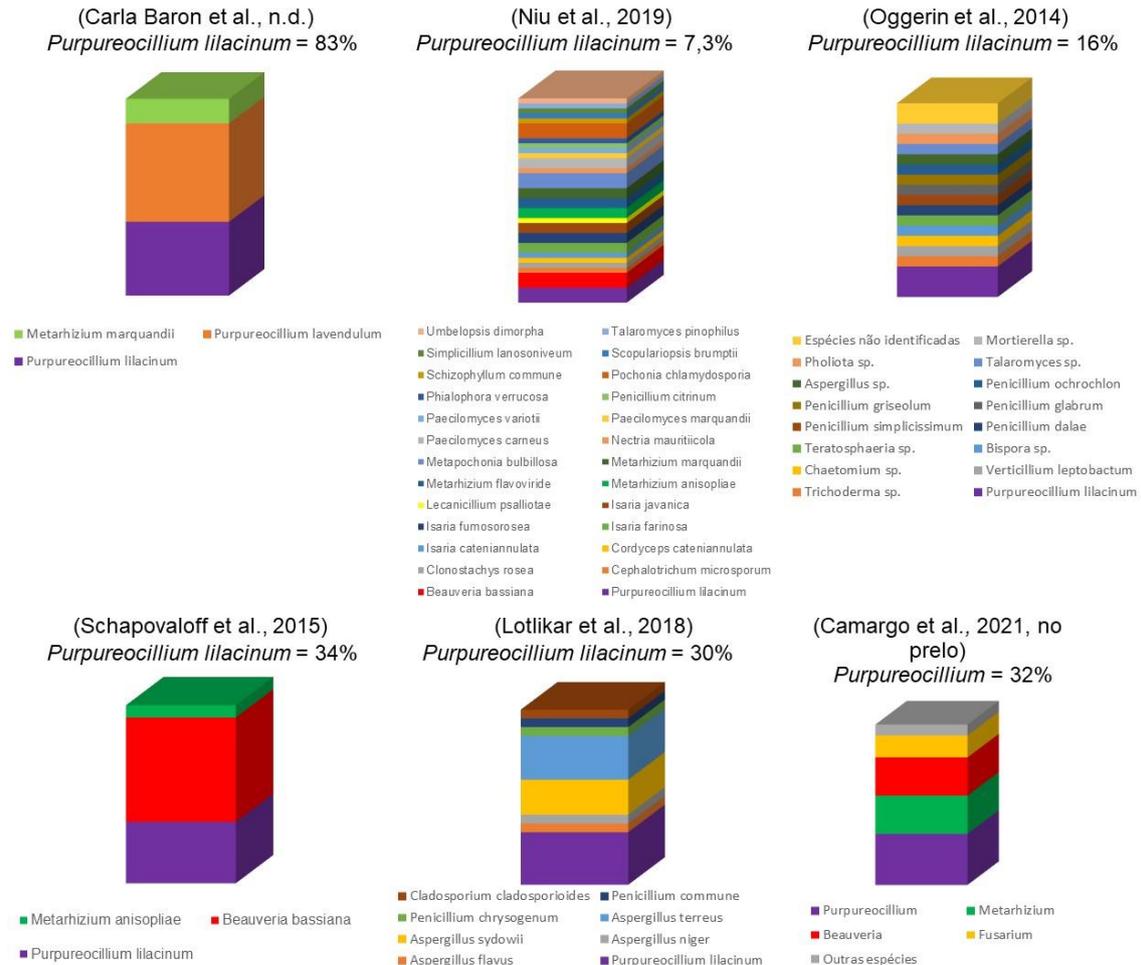
apenas como patógenos de insetos, mas também, por exemplo, como fungos endofíticos (Niu et al. 2019; Schapovaloff et al. 2015; Thi et al. 2016; Wakil et al. 2013). Para analisar adequadamente a diversidade de FEPs, tanto em relação à variedade de espécies, quanto para desvendar como seus nichos ecológicos foram estabelecidos, é preciso entender a sua evolução. Estudos filogenéticos sugerem que, apesar dos processos de infecção e desenvolvimento destes fungos serem similares em espécies distintas, a patogenicidade de fungos direcionada a insetos surgiu múltiplas vezes e de forma independente ao longo de milhões de anos, por meio de evolução convergente (Butt 2000; D'Alessandro, Humber, and Luz 2012; Hu et al. 2014; Zheng et al. 2013). Um fato que corrobora tal hipótese é o de que diferentes espécies e linhagens de FEPs apresentam diferentes graus de virulência e especificidade de hospedeiros (Butt et al. 2016).

A história evolutiva dos FEPs ainda apresenta lacunas, principalmente devido à escassez de evidência fóssil e ao intercâmbio de material genético, tanto intra quanto interespecífico, mas tem se obtido progresso considerável em sua elucidação. Sabe-se que ao longo de sua evolução os mesmos adquiriram (por meio de eventos de hibridização interespecífica e transferência horizontal de material genético, entre muitos outros, Figura 4) genes que lhes concederam os mecanismos moleculares necessários à invasão, evasão do sistema imune de seus hospedeiros e aquisição de fatores de virulência, tornando-os capazes de infectar artrópodes (Barelli et al. 2016; Gao et al. 2011). Surpreendentemente, foi comprovado, por meio de genômica comparativa, que os FEPs são mais próximos evolutivamente aos fungos endofíticos e fito patogênicos do que aos fungos que são patógenos a animais (Gao et al. 2011).



**Figura 4. Modelo proposto à evolução de fungos entomopatogênicos.** O acúmulo de genes de patogenicidade contra plantas potencialmente permitiu que fungos saprófitos adquirissem a capacidade de colonizar as raízes de plantas. A pressão seletiva teria, então, empurrado os fungos fitopatogênicos à simbiose com seus hospedeiros vegetais e posteriormente eventos de recombinação/insercionais permitiram a infecção de artrópodes (Barelli et al. 2016).

Entender a história evolutiva dos FEPs é de grande auxílio ao entendimento da diversidade de espécies presentes em determinado ambiente. O gênero *Purpureocillium* é um bom exemplo disso. O gênero *Purpureocillium* spp. compreende fungos com múltiplos nichos ecológicos, sendo endofíticos, saprófitos, nematocidas e entomopatogênicos (Barelli et al. 2016; Jaber and Ownley 2018; Luangsa-Ard et al. 2011). Além disso, possui espécies amplamente distribuídas no mundo, compondo uma parcela significativa da diversidade de fungos filamentosos dos solos e sedimentos de diversos tipos de ambientes, conforme relatado em muitos estudos, na Figura 5 (Carla Baron, De Souza Pollo, and Rigobelo 2020; Lotlikar et al. 2018; Niu et al. 2019; Oggerin, Rodr, and Amils 2014; Schapovaloff et al. 2015).



**Figura 5. Diversidade fúngica.** Isolados fúngicos identificados e descritos em diversos trabalhos, dando ênfase à ocorrência de *Purpureocillium lilacinum* ou *Purpureocillium* spp. observada. Fontes na imagem.

#### 1.4. Gênero *Purpureocillium*

Dentre os diversos gêneros de FEPs, o gênero *Purpureocillium* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) apresenta grande potencial biotecnológico (Goffré and Folgarait 2015). No entanto, esse gênero ainda é pouco explorado, compreendendo duas espécies descritas (em termos de morfologia, em conjunto com sequenciamento de região ITS) e outras três espécies cripticas (Spatafora et al., 2015). *Purpureocillium lilacinum* é a espécie mais bem descrita do gênero, tanto por métodos clássicos, baseados em morfologia macro- e microscópica, quanto por métodos moleculares, tais como sequenciamento de ITS (Perdomo et al. 2013). O conhecimento acerca das

outras espécies, entretanto, ainda é muito limitado, devido à menor ocorrência e à falta de estudos destas (Luangsa-Ard et al. 2011). Além disso, por vezes a descrição baseada em morfologia é imprecisa, pois os isolados podem apresentar similaridades com fungos anamórficos de outros gêneros, tais como *Acremonium*, *Paecilomyces* e *Isaria* (Calvillo-Medina et al. 2021; Sung et al. 2007). As espécies do gênero *Purpureocillium* podem se desenvolver em uma ampla faixa de temperaturas - de 8 a 38 °C, apresentando crescimento ideal na faixa de 26 a 30 °C e também em uma faixa ampla de pH e substratos (Kepenekci et al. 2015).

*Purpureocillium lilacinum*, outrora conhecido como *Paecilomyces lilacinus*, é a espécie mais bem caracterizada e explorada neste gênero. É importante ressaltar que o gênero *Purpureocillium* foi apenas recentemente proposto dentro da família Ophiocordycipitaceae, baseado em análises das sequências das regiões ITS e do fator de alongação transcricional 1- $\alpha$  (TEF) da espécie *P. lilacinum*, sendo originalmente classificado no gênero *Paecilomyces* (Luangsa-Ard et al. 2011). Esta espécie já foi isolada de uma ampla variedade de ambientes, incluindo solos cultivados, florestas, pradarias, desertos, sedimentos estuarinos, lodo de esgoto e carcaças de insetos em diversas localidades do mundo (Perdomo et al. 2013). É conhecido primeiramente como patógeno de diversas espécies de nematoides, visto que muitos estudos confirmaram sua presença em ovos e, ocasionalmente, em fêmeas de nematoides (Mendoza, Sikora, and Kiewnick 2007). Além disso, esporos têm sido frequentemente detectados na rizosfera de muitas plantas de importância agrícola (Ek-Ramos et al. 2013; Schapovaloff et al. 2015). *P. lilacinum* já é utilizado comercialmente como nematicida (Dahlin et al. 2019).

*P. lilacinum* foi isolado com sucesso a partir de amostras de solos dos estados de São Paulo e Paraná, Brasil (Baron et al. 2019; Schapovaloff et al. 2015), de sedimentos do Rio Tinto, na Espanha (Oggerin et al. 2014), do sul da China (Niu et al. 2019), Do estado do Texas, EUA (Ek-Ramos et al. 2013), de um jardim fúngico de uma colônia de formigas cortadeiras (*Acromyrmex lundii*) na Argentina (Goffré and Folgarait 2015), de manguezais na Índia e inclusive de sedimentos marinhos provenientes do Mar Árábico (Lotlikar et al. 2018). Isso evidencia o quão amplamente distribuído este fungo é.

### 1.5. Caracterização de *Purpureocillium lilacinum*

Por ser a espécie de maior ocorrência dentre *Purpureocillium* spp., *P. lilacinum* é frequentemente usado com modelo para o resto de seu gênero. Morfologicamente, *P. lilacinum* apresenta micélio denso com a formação de conidióforos com fiálides em cujas extremidades se formam longas cadeias de conídios. Em cultura, *P. lilacinum* forma colônias circulares que atingem um diâmetro de 5 a 7 cm em 14 dias a 25 °C (Kepenekci et al. 2015), consistindo em uma camada basal sobre a qual se forma um micélio aéreo flocoso. As colônias, primeiramente, apresentam coloração esbranquiçada com um aspecto similar ao de algodão, e, em decorrência da esporulação, adquirem uma coloração roxa ou rosada na porção superior. O reverso da colônia é geralmente incolor, mas alguns isolados apresentando colorações similares à dos esporos ou amareladas no reverso já foram observados (Perdomo et al. 2013).

Hifas vegetativas têm paredes lisas, hialinas e com 2,5–4,0 µm de largura. Os conidióforos originados a partir de hifas submersas têm de 400 a 600 µm de comprimento, ao passo que conidióforos oriundos de hifas aéreas apresentam metade deste comprimento. As células conidiogênicas fialídicas apresentam um segmento basal cilíndrico e grosso, que afunila num pescoço delgado. Os conídios situam-se dispostos em cadeias divergentes, catenados (como um colar de pérolas) de forma elipsoide a fusiforme. Estas células apresentam paredes lisas ou ligeiramente rugosas (Perdomo et al. 2013; Schumacher et al. 2014).

Além disso, as espécies de *Purpureocillium* spp. são, geralmente, fáceis de cultivar e isolar, pois as espécies deste gênero são conhecidas por serem produtoras de uma ampla gama de enzimas degradativas, tais como proteases, queratinases, quitinases e, inclusive, sendo o primeiro relato deste gênero da produção de laminarases (enzimas degradadoras do polissacarídeo Laminarina) pertencente a uma linhagem de *Purpureocillium lilacinum* (Gupta, Leathers, and Wicklow 1993; Khan, Williams, and Nevalainen 2003). Essas enzimas fornecem uma versatilidade metabólica notável, permitindo que o fungo cresça em uma ampla variedade de substratos (Cavello et al. 2015).

## **1.6. Potenciais aplicações**

### **1.6.1. Indução do crescimento vegetal**

As associações com microrganismos favorecem a sobrevivência das plantas no meio ambiente por diversos motivos. Os fungos mutualísticos de plantas são atualmente reconhecidos como uma nova e importante fonte de compostos bioativos. Eles produzem um número significativo de metabólitos secundários, incluindo fitohormônios (auxinas, giberelinas, citocininas e ácido abscísico) e compostos antifúngicos e antibacterianos. Estudos demonstraram que as plantas tratadas com uma variedade de fungos simbióticos são frequentemente mais saudáveis do que as plantas não tratadas (Baron et al. 2019; Carla Baron, De Souza Pollo, and Rigobelo 2020).

Essas associações planta-fungo são estabelecidas principalmente por dois grupos de fungos: fungos micorrízicos e endofíticos (Bonfante & Genre, 2010). Fungos micorrízicos são aqueles que vivem associados às raízes de plantas de forma facultativa. Já os endofíticos são aqueles capazes de viver endossimbioticamente com plantas. Eles podem atuar de muitas maneiras, promovendo o crescimento das plantas, aumentando a taxa de germinação, melhorando o estabelecimento de mudas e aumentando a resistência da planta a estresses bióticos e abióticos, produzindo compostos antimicrobianos, fitormônios e vários outros compostos bioativos. Além disso, os fungos endofíticos participam da aquisição de nutrientes do solo, auxiliando as plantas a absorver tanto macronutrientes como fósforo, nitrogênio e potássio, quanto micronutrientes como zinco, ferro e cobre (Behie and Bidochka 2014a).

Fungos entomopatogênicos (FEPs) e/ou nematófagos são particularmente interessantes nesse quesito, pois diversos deles eram estritamente endofíticos, originalmente (Figura 4). Além disso, por meio da decomposição dos cadáveres de seus hospedeiros, os FEPs oferecem fontes adicionais de diversos nutrientes às plantas associadas, por exemplo: nitrogênio oriundo da degradação das proteínas e quitina de insetos (Behie and Bidochka 2014b; Behie, Zelisko, and Bidochka 2012). Curiosamente, a aderência dos esporos de fungos à superfície das plantas (seja sobre as folhas, raízes ou outros órgãos) é mediada por proteínas similares, em termos de

estrutura, às adesinas e hidrofobinas, também responsáveis pela fixação dos fungos à cutícula dos insetos (Wang and St. Leger 2007).

No caso de *P. lilacinum* foi confirmado que esta espécie produz uma ampla variedade de metabólitos benéficos ao crescimento vegetal. Dentre estes, estão incluídas substâncias poliméricas extracelulares complexantes de íons metálicos, ácido indol-acético e amônia, além de induzir a precipitação de Fósforo biodisponível no solo (Carla Baron et al. 2020). Adicionalmente, foi descrito que *P. lilacinum* é capaz de induzir a produção de ácido jasmônico, o qual é um importante fitormônio de defesa a predadores e patógenos, quando suspensões de esporos do fungo são borrifadas sobre as folhas de plantas previamente ao contato com insetos predadores (Hotaka et al. 2015).

*Purpureocillium lilacinum* pode ainda contribuir ao crescimento vegetal por apresentar atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos (Carla Baron et al. 2020). Isso foi confirmado por meio de ensaios de cultura dupla em meio batata dextrose ágar (BDA) nos quais *P. lilacinum* reduziu o crescimento dos fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* e *F. graminearum* (Cavello et al. 2015). Foi proposto que *P. lilacinum* é capaz de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares inibidoras do crescimento de outros fungos, tais como proteases, glucanases e quitinases, a qual foi confirmada observando-se que o sobrenadante livre de células proveniente de culturas líquidas de *P. lilacinum* obteve similar atividade antifúngica (Fenice et al. 1998).

### **1.6.2. Patogenicidade**

Estudos têm revelado o potencial biotecnológico de *P. lilacinum* e sua potencial aplicação como agente de controle biológico. *Purpureocillium* spp. tem sido utilizado, já há vários anos, para controlar populações de nematóides fitoparasitas (Singh, Pandey, and Goswami 2013).

A virulência de um patógeno fúngico contra seu hospedeiro é determinada por três fatores: a concentração de esporos (por exemplo, em uma suspensão), o tempo de exposição e as condições ambientais preponderantes durante o contato entre hospedeiro e fungo (Ansari et al. 2004). Diversos trabalhos têm evidenciado que este fungo pode ser usado no controle biológico de diversos tipos de artrópodes, tais como *Tetranychus*

*urticae*, *Acromyrmex lundii* e *Amblyomma cajennense* (D'Alessandro et al. 2012; Goffré and Folgarait 2015; Shin et al. 2017). Além disso, foi demonstrado que *P. lilacinum* apresentou uma alta taxa de virulência contra *Thrips palmi*, uma praga comum em plantações de orquídeas no sudeste asiático (Hotaka et al. 2015).

Recentemente foi observado que *P. lilacinum* é um agente promissor ao controle biológico da mosca das frutas mexicana, *Anastrepha ludens*, pois apesar de ter apresentado um LT50 (tempo letal para causar a morte de 50% da população de uma praga-alvo) relativamente longo, o fungo se mostrou eficaz em infectar grandes porcentagens das populações expostas, além de reduzir de forma significativa a taxa de viabilidade dos ovos da mosca e de apresentar um efeito letal em várias gerações de moscas após a infecção (Toledo-Hernández et al. 2019).

Adicionalmente, foi observado que *P. lilacinum* é capaz de alterar o comportamento de alguns de seus hospedeiros, manipulando o sistema motor destes de forma a alterar seu comportamento com fins de maximizar a dispersão de seus esporos (Eberhard et al. 2014). Entretanto, até o momento apenas uma espécie de seu leque de hospedeiros, *Edessa rufomarginata*, comprovadamente apresentou alterações comportamentais que evidenciaram a manipulação de seu sistema-motor durante o processo de infecção, as quais foram surpreendentemente similares às apresentadas por formigas infectadas por *Ophiocordyceps unilateralis* (Evans, Elliot, and Hughes 2011).

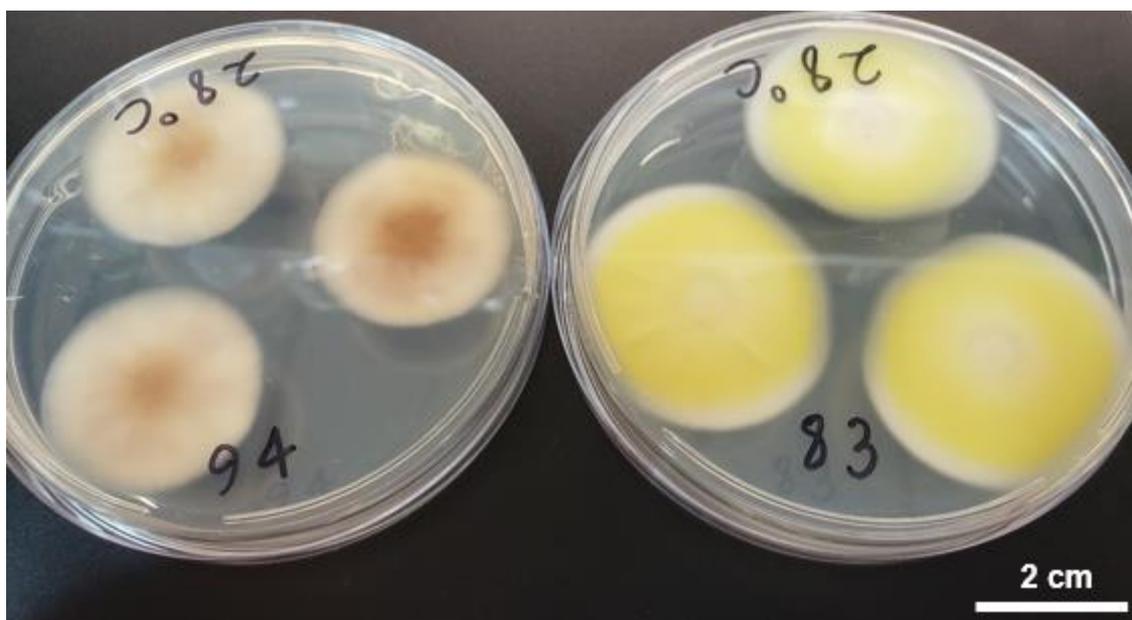
### **1.6.3. Metabólitos secundários**

Metabólitos secundários (MSs) são moléculas não essenciais ao ciclo de vida dos seres vivos que os produzem, mas, tais moléculas, desempenham um papel importante nas respostas a estímulos ambientais e na interação com outros organismos. A biossíntese de MSs está geralmente associada à diferenciação ou desenvolvimento celular (Calvo et al. 2002). MSs desempenham um grande número de funções em FEPs, dentre elas: auxiliam no desenvolvimento, induzem esporulação, podem apresentar atividade antibiótica (i.e., inibindo o desenvolvimento de antagonistas e competidores), auxiliam na proteção contra estressores ambientais (e.g., pigmentos), além de

atuarem como fatores de virulência (Bu'Lock 1961; Keller 2019; Park et al. 2004; Rohlfs and Churchill 2011; Wang et al. 2016).

Diversos estudos revelaram que *Purpureocillium* spp. produzem uma ampla variedade de MSs, os quais apresentam muitas funções biológicas. Leucinostatinas são uma família de lipopeptídeos, conhecidos por apresentarem atividade fitotóxica, antifúngica e antibacteriana, primeiramente descobertos e isolados de *P. lilacinum* (Arai et al. 1973). Foi relatado a partir do estudo de isolados australianos deste fungo que estes metabólitos secundários possuem também ação nematicida (Park et al. 2004). Recentemente, o agrupamento gênico envolvido na biossíntese das leucinostatinas foi identificado em *P. lilacinum*, o que permitiu detalhamento da rota biossintética (Wang et al. 2016).

Outro exemplo são as defensinas: purlisina-NT e purlisina-CT. Tais moléculas apresentam atividades antibacteriana e inibem canais de potássio, respectivamente (Shen et al. 2020). *P. lilacinum* também é capaz de produzir acremoxantona C e acremonidina A, as quais agem como inibidoras da calmodulina humana (Madariaga-Mazón et al. 2013). Outra característica de *Purpureocillium* spp. é a variação de coloração do reverso das colônias de diferentes isolados (Figura 6).



**Figura 6. Comparação do reverso de colônias dos isolados AS94 e AS83.** Ambos foram cultivados simultaneamente sob a mesma temperatura

durante 6 dias. É possível observar que isolados diferentes produzem pigmentos distintos no reverso de suas colônias, evidenciando a variabilidade na produção de metabólitos produzidos por isolados de *Purpureocillium* spp..

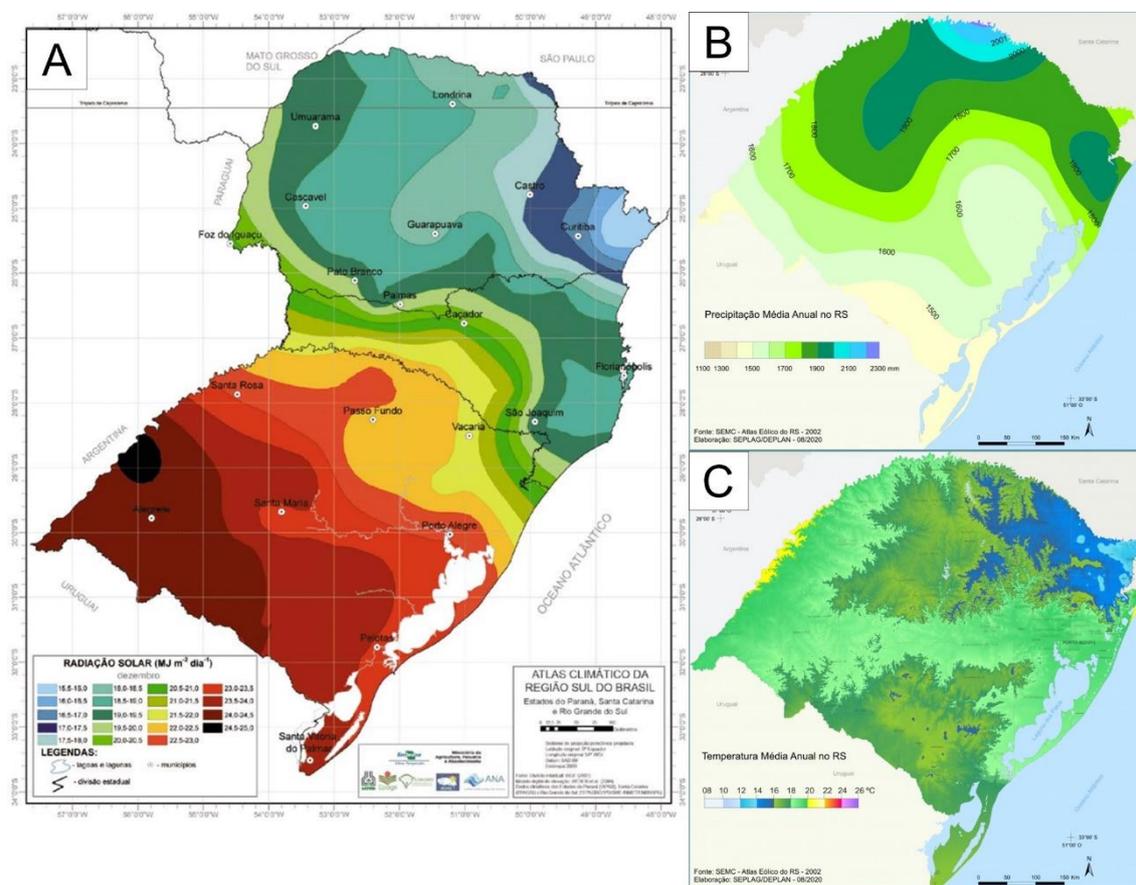
### **1.7. Tolerância a estresses abióticos**

Um dos fatores mais importantes a se considerar durante o estudo de FEPs é a resistência destes a estresses abióticos. A grande maioria dos fungos mostra boa performance em laboratório, mas quando testados em campo, em contrapartida, muitas espécies se mostram menos eficazes do que se espera (Butt et al. 2016). Isso se deve ao fato de que os fatores ambientais podem limitar significativamente o crescimento de microrganismos, sejam eles procariotos ou eucariotos. Biopesticidas fúngicos devem tolerar uma ampla gama de estresses abióticos, sejam eles climáticos (temperaturas elevadas ou baixas, flutuações de temperatura, teor de umidade, radiação UV) ou seráficos, ou seja, relativos ao tipo de solo (pH, disponibilidade de elementos-traço) do local onde se deseja ser feita sua aplicação (Moazami 2019). Portanto, os FEPs desenvolveram vários mecanismos para resistir a estresses abióticos, geralmente envolvendo genes ligados ao dobramento de proteínas, equilíbrio osmolítico, proteção contra estresse oxidativo e integridade da parede celular (Ortiz-Urquiza and Keyhani 2015).

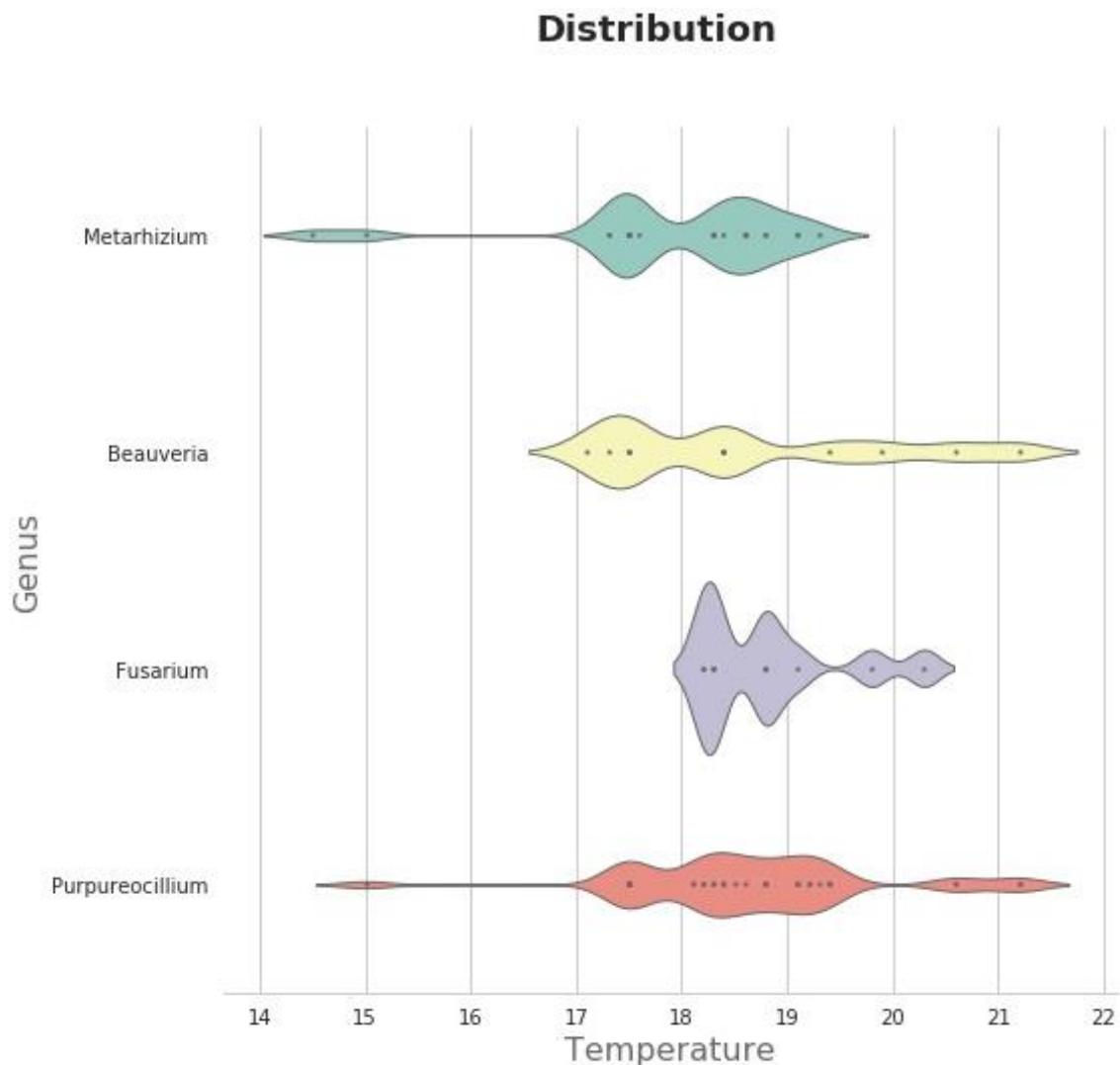
Muitos fatores abióticos são conhecidos por limitar a capacidade dos agentes fúngicos de controlar pragas de artrópodes. Dentre eles, a radiação solar do espectro UV (UV-A e UV-B) é provavelmente o fator ambiental mais prejudicial à viabilidade de fungos aplicados em campo para fins de controle biológico (Ignoffo and Garcia 1992). A maioria dos isolados tolerantes à radiação UV são capazes de sobreviver a algumas horas de exposição direta à luz solar, mas os isolados suscetíveis a UV rapidamente sucumbem (Nascimento et al. 2010). A exposição ao UV-B em particular leva ao atraso da germinação dos conídios sobreviventes e retarda o desenvolvimento da maioria dos fungos, o que diminui significativamente a persistência e eficácia de propágulos infecciosos no campo (Fernandes et al. 2015).

O estado do Rio Grande do sul situa-se em uma região de clima subtropical e, portanto, está sujeito a uma multiplicidade de condições

ambientais, bem como a grandes amplitudes de fatores como temperatura, precipitação e irradiação solar, conforme mostrado na Figura 7 (Jorge and Mendonça 2017). Somado a isso está o fato do estado apresentar grande diversidade de formações geológicas, o que, somado aos fatores climáticos, proporciona uma enorme variedade de tipos de solo (Buriol et al. 2007).



**Figura 7. Fatores ambientais do estado do Rio Grande do Sul. (A) mapa de irradiação solar. (B) mapa de precipitação pluviométrica. (C) Mapa das temperaturas médias anuais. Fontes nas imagens.**



**Figura 8. Ocorrência de FEPs de acordo com faixas de temperatura.** Distribuição da ocorrência de diversos gêneros de FEPs (*Metarhizium*, *Beauveria*, *Fusarium* e *Purpureocillium*) de acordo com as faixas de temperatura nas quais estes foram detectados. (Camargo et al. 2021, no prelo).

*P. lilacinum* sofre inibição total da germinação de seus esporos quando exposto a temperaturas abaixo de 10 °C, mas tolera relativamente bem temperaturas de até 38 °C e períodos breves de exposição à radiação UV-B (Shin et al. 2017). A Figura 8 mostra as faixas de temperatura nas quais diversos gêneros de FEPs foram detectados. Pode-se ver que *Purpureocillium* spp. aparentemente tolera um amplo espectro de temperaturas. Porém, ainda se faz necessária realização de análises mais meticulosas para determinar as faixas de temperatura ideais ao crescimento de *Purpureocillium* spp..

O pH do solo e da água em determinado ambiente é outro fator que deve ser levado em consideração. O mesmo é o principal fator-chave que determina a biodisponibilidade de diversos micronutrientes, particularmente de íons metálicos, e também determina a composição da microbiota em determinado ambiente, seja o último terrestre ou aquático. Foi demonstrado que *P. lilacinum* é fungo ácido-tolerante, por ser capaz de colonizar ambientes de pH extremamente baixo (inferior a 3,0) e que é capaz de tolerar altas concentrações de metais pesados e enxofre em solução, pois o mesmo foi isolado e identificado como uma das espécies presentes nos biofilmes polimicrobianos encontrados nos bancos do rio Tinto, na Espanha, um dos ambientes mais inóspitos na superfície do planeta Terra. *P. lilacinum* é até mesmo capaz de formar biomineralizações de cristais do mineral Jarosita, cuja fórmula química é  $KFe^{3+}_3(OH)_6(SO_4)_2$  (Oggerin et al. 2014).

Posteriormente, fora confirmado em mais detalhes que *P. lilacinum* é capaz não apenas de suportar teores elevados de Cromo ( $Cr^{+6}$ ), como também de remover o metal de solução e convertê-lo em formas menos tóxicas (Lotlikar et al. 2018). Em outro estudo, o fungo também foi capaz de tolerar e bioacumular Arsênio ( $As^{+3}$ ) de seu meio (Ceci et al. 2020). Adicionalmente, foi reportado que também é um fungo halo-tolerante, por ter apresentado crescimento e formação de biomassa expressivos, quando cultivado tanto em meio líquido desprovido de salinidade quanto em níveis de salinidade 2 e até 3 vezes superiores aos dos oceanos, respectivamente (Lotlikar and Damare 2018).

### **1.8. Espécie-alvo de hospedeiro**

*Spodoptera frugiperda* (Noctuidae: Lepidoptera) é uma espécie artrópode que nos anos recentes vem se tornando uma das pragas mais destrutivas à agricultura comercial (Wang et al. 2020). As larvas apresentam comportamento polífago, apetite voraz e ocorrência em surtos periódicos, dando-lhes o nome de “Lagarta do exército” (Montezano et al. 2018). Nativa da América do Norte, *S. frugiperda*, pode se adaptar e resistir a diferentes condições climáticas e, por isso, tem rapidamente invadido diversas regiões do

mundo, levando a grandes prejuízos na produção de muitos cultivares (Wang et al. 2020).

Larvas de *S. frugiperda* podem se alimentar de pelo menos 353 espécies de plantas pertencentes a 76 famílias (Montezano et al. 2018). A extensa lista de plantas hospedeiras de *S. frugiperda* pode ser influenciada por vários fatores biológicos, incluindo o comportamento de oviposição da mariposa fêmea e o movimento larval. Fêmeas adultas de *S. frugiperda* põem ovos em várias espécies de plantas em um mesmo ambiente, desde as mais abundantes até as mais escassas, particularmente na ausência de hospedeiros preferidos (Hallman 1979; Montezano et al. 2018).

O controle convencional por meio de pesticidas químicos de *S. frugiperda* se mostrou pouco eficaz (Cruz 2002; Day et al. 2017), e o conhecimento sobre seus patógenos ainda é limitado. Portanto é de grande importância estudar os microrganismos com potencial de utilização como agentes de controle biológico desta praga.

## 2. JUSTIFICATIVA

O controle biológico de pragas oferece uma alternativa eficaz e mais segura à saúde humana e com menor impacto ao meio ambiente. Quando comparado ao controle químico, apresenta maior especificidade à praga-alvo e menor risco de contaminação ao meio ambiente. Porém, uma das principais limitações do uso de fungos como agentes de controle biológico é a baixa variedade de espécies estudadas e descritas suficientemente para permitir seu uso em escala comercial. É de grande importância que sejam identificadas e descritas novas espécies de fungos que possam ser utilizadas como agentes de controle biológico, e que espécies já conhecidas sejam estudadas de forma mais aprofundada. Além disso, dada a relevância regional deste trabalho, é de grande importância prospectar e estudar espécies autóctones, ou seja, nativas da região onde se deseja fazer o controle de artrópodes, pois estas estão adaptadas às condições ambientais do local e elimina os riscos associados à introdução de espécies exóticas no ambiente. Isso permitirá a expansão do controle biológico de pragas não somente como nicho de mercado, mas também como atividade auxiliar à agricultura, a fim de reduzir o consumo de pesticidas químicos e mitigar seus efeitos colaterais nocivos tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente. Além disso, permitirá o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas dos FEPs. Este trabalho, por se tratar de um estudo de linhagens fúngicas isoladas do Rio Grande do Sul, tem forte importância regional, considerando os fatores de adaptação de *Purpureocillium* spp. ao clima, solos e flora locais, bem como da sua aplicação em pragas de interesse agrícola no estado.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar, a partir de um banco de isolados fúngicos oriundos de amostras de solo do estado do Rio Grande do Sul, fungos do gênero *Purpureocillium* com potencial aplicação como agentes de controle biológico.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Identificar fungos do gênero *Purpureocillium* presentes no banco de isolados do RS;
- Avaliar o desenvolvimento das colônias de cada isolado sob diferentes temperaturas;
- Realizar bioensaios para verificar se os isolados apresentam patogenicidade contra larvas de *Tenebrio molitor*.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

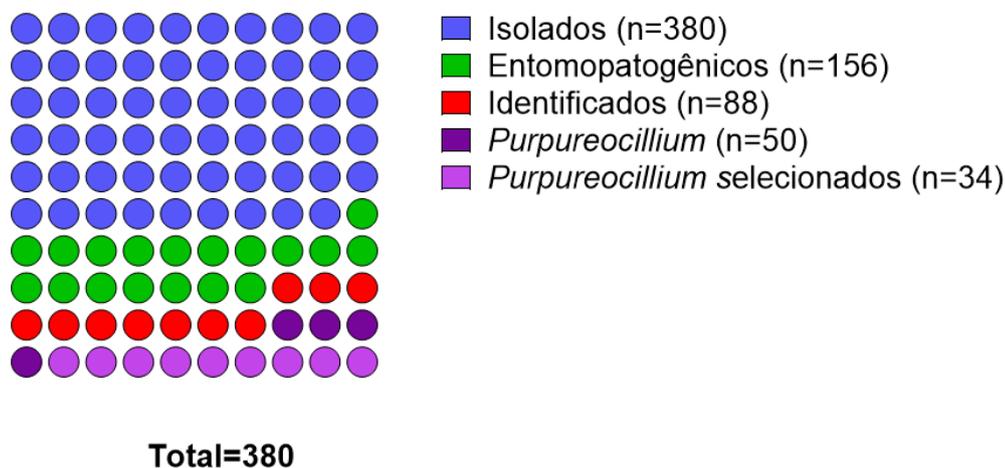
#### 4.1. Isolados e análises morfológicas

Um banco de fungos isolados a partir da coleta de amostras de solo de diversas localidades do estado do Rio Grande do Sul, com aproximadamente 380 amostras fúngicas, foi estabelecido no Laboratório 217 do Centro de Biotecnologia da UFRGS (Camargo *et al.*, 2021, no prelo). A partir desse banco foram identificados os fungos do gênero *Purpureocillium* que foram estudados neste trabalho. O isolamento baseou-se na diluição das amostras de solo com água destilada estéril, seguido por diluição seriada para o estabelecimento da melhor condição de isolamento.

A diluição foi plaqueada em meio Ágar-Aveia (CTAB+ Cloranfenicol), (Pereira *et al.* 2014) para selecionar fungos filamentosos e restringindo o crescimento de bactérias e leveduras. Após incubação a 28 °C por 10 dias foi feita a seleção de diferentes morfotipos dentre as colônias crescidas. Posteriormente foi feita a extração de DNA e sequenciamento da região ITS dos diferentes isolados. Dentre eles, o isolado AS4, foi constatado como

pertencente à espécie *Purpureocillium lilacinum*. Este, por sua vez, foi utilizado como padrão de referência de morfologia (tanto macroscópica quanto microscópica) para os demais isolados estudados neste trabalho.

Outros 50 isolados foram selecionados por serem prováveis candidatos de pertencerem ao gênero *Purpureocillium*, baseado nas características macroscópicas de colônia, bem como nas análises de microscopia feitas para visualizar e descrever as características morfológicas de hifa, esporos e conídios de todos os isolados candidatos. Dentre estes, 34 dos isolados de *Purpureocillium* foram selecionados para serem estudados neste trabalho, baseado nas observações de macro e microscópicas e pelo potencial entomopatogênico verificado contra larvas de *Tenebrio molitor* (Figura 9).



**Figura 9. Quantificação e classificação de fungos no banco de isolados do LBCMFF.** Dentre os 380 fungos presentes no banco de isolados do RS 156 apresentaram atividade entomopatogênica. Destes, 88 foram identificados em nível de espécie, dos quais 50 foram identificados como pertencentes ao gênero *Purpureocillium* e 34 foram selecionados para serem estudados neste trabalho (Camargo et. al., 2021, no prelo).

Em seguida, as culturas dos isolados selecionados foram repicadas e mantidas em meio MCc (meio Cove completo, composição disponível na Tabela 1, sendo acrescentados, após esterilização, soluções de sais e elementos traços, 2 mL e 40 µL para 100 mL de meio, respectivamente) e cultivadas durante sete dias. As culturas foram posteriormente usadas para a obtenção de suspensões de esporos.

**Tabela 1.** Composição do meio MCc, para 100 mL de volume total.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade (gramas)</b>
NaNO <sub>3</sub>	0,6
Glicose	1,0
Peptona	0,2
Extrato de levedura	0,05
Caseína	0,15
Ágar	1,5

#### **4.2. Preparo das suspensões de esporos**

Os isolados foram cultivados por 14 dias em estufas a 28 °C em meio MCc. Ao fim deste período as placas foram lavadas com solução estéril de Tween-80 a uma concentração de 0,01% (v/v), utilizando 5 mL desta solução por placa. Com o auxílio de uma alça de Drigalski foi feito o esfregaço das colônias para obter-se o rompimento da hidrofobicidade dos esporos e conseqüentemente a suspensão destes. A suspensão obtida foi coletada e armazenada em tubos de 15 mL para uso nos experimentos subsequentes de imediato ou no dia seguinte.

As suspensões em solução de tween-80 foram centrifugadas a 5.500 RPM por 7 minutos a 6 °C para separar os esporos dos fragmentos de micélio. O sobrenadante contendo fragmentos de micélio foi descartado e os esporos sedimentados foram ressuspensos em água destilada estéril. Por fim, as concentrações de esporos de cada suspensão final foram definidas em câmaras de Neubauer e posteriormente padronizadas para se obter as suspensões finais, com as concentrações de esporos desejadas para cada um dos experimentos subsequentes.

#### **4.3. Extração de DNA e sequenciamento de região ITS**

Para a extração de DNA 10 µl das suspensões dos isolados 155 e 159 foram inoculadas em meio MCc líquido e cultivadas a 28 °C por 72 horas. O

micélio de cada isolado foi coletado por filtração a vácuo, seguido do congelamento das amostras em nitrogênio líquido e armazenamento das mesmas a -80 °C.

A etapa seguinte consistiu na extração do DNA genômico dos isolados utilizando o protocolo de Fenol-Clorofórmio padrão (Miao et al. 2014; Oliveira et al. 2007). Cada amostra foi macerada cuidadosamente usando gral e pistilo até completa pulverização. O material macerado foi adicionado a microtubos estéreis de 2 mL contendo 0,75 mL de solução de lise (Tabela 2) e 0,3 mL de fenol tamponado a pH 8,0, sendo em seguida agitadas em vórtex por 15 minutos e por fim centrifugadas a 14.000 RPM por 10 minutos. Após, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para microtubos estéreis de 2 mL. Foram adicionados clorofórmio e fenol tamponado, cada um em volumes equivalentes a metade do volume obtido de sobrenadante da etapa anterior e mistura resultante foi novamente centrifugada por 10 minutos e lavada com meio volume de clorofórmio.

**Tabela 2.** Composição da solução de lise, para 10 mL de volume total.

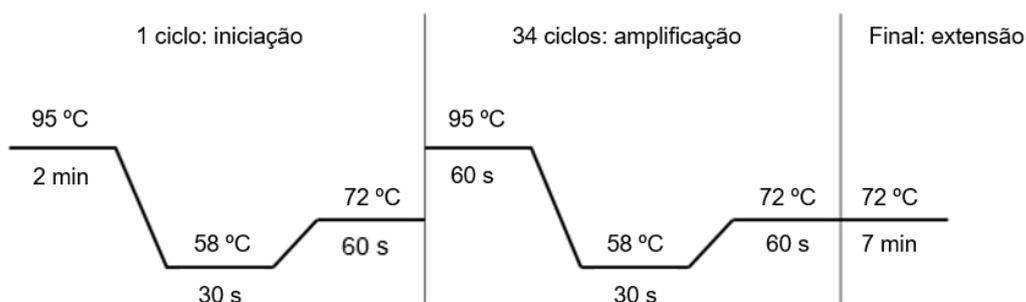
<b>Componente</b>	<b>Quantidade (mililitros)</b>
Água MilliQ	3,6
Tris-HCl	1,0
EDTA 0,5 M	0,2
NaCl 5 M	1,2
SDS 10%	4,0

Em seguida, o novo sobrenadante foi coletado e precipitado com volume equivalente de isopropanol durante 2 horas à -20 °C. A mistura foi então centrifugada por mais 10 minutos, em sequência sendo descartado o sobrenadante. O material sedimentado foi lavado com 0,5 mL de etanol 70% gelado e centrifugado por 1 minuto e em seguida seco em uma centrífuga de rotação a vácuo a 45 °C em ciclos de 15 minutos. Por fim, o pellet foi ressuscitado em 100 µL de água destilada estéril e armazenado a -20 °C para preservar o DNA purificado.

As sequências de DNA genômico foram amplificadas por PCR, utilizando primers específicos para amplificação da região ITS. Foi utilizado o kit CellCo®,

nas seguintes condições: 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase; 1,5  $\mu\text{L}$  de primer *forward*; 1,5 de primer *reverse*; 5,0  $\mu\text{L}$  de dNTPs; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X e 13,4  $\mu\text{L}$  de água de PCR para completar 24  $\mu\text{L}$  de mix. Cada amostra totalizou 25  $\mu\text{L}$  com a adição de 1,0  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA dos isolados.

Foi feita uma reação de PCR com um programa específico para amplificação da região ITS. A reação iniciou com uma etapa de 2 minutos a 95 °C para desnaturar a dupla fita de DNA seguida de 30 segundos a 58 °C e 60 segundos a 72 °C. Em seguida foram feitos 34 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos, encerrando com um período de extensão final de 72 °C por 7 minutos, totalizando 1 hora e 40 minutos (o programa inserido no termociclador está esquematizado na Figura 10).



**Figura 10. Etapas utilizadas na reação de PCR.** Esquema do programa inserido no termociclador.

Os produtos da PCR foram coletados, adicionando 2  $\mu\text{L}$  de tampão de migração de eletroforese a cada amostra e feita uma eletroforese destas e do controle sem DNA em gel de agarose (0,8% de agarose acrescida de brometo de etídio) imerso em TAE 1 X numa cuba de eletroforese com diferença de potencial de 100 V durante 40 minutos. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador sob luz UV para verificar a presença dos amplicons amplificadas. Confirmada a presença dos amplicons amplificadas no gel, as bandas contendo DNA foram excisadas com bisturi e coletadas em microtubos de 2 mL.

Os fragmentos de gel contendo o DNA de cada isolado foram separadamente tratados com o kit Purelink®. Para a purificação foram utilizadas colunas e reagentes do kit Purelink de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific). As amostras de DNA

purificadas foram então desidratadas em Speed Vac em ciclos de 15 min a 45 °C. A ressuspensão foi feita em água destilada estéril e a quantificação foi feita em Nanodrop. Por fim, ao DNA purificado foram adicionados os primers ITS4 e ITS5. A solução final, com os primers adicionados, foi enviada para sequenciamento pela empresa ACTGene análises moleculares (Centro de Biotecnologia, UFRGS).

As sequências do tipo eletroferograma (.ab1) obtidas foram agrupadas (*forward* e *reverse*) e submetidas na plataforma de Electropherogram quality analysis® (análise de qualidade de eletroferograma) da Embrapa, sem uso de vetores (Togawa et al. 2006; Togawa and Brigido 2003). Após a verificação da qualidade das sequências, foi realizada a unificação destas em um contig (junção das sequências *forward* e *reverse* da região ITS, com remoção das extremidades, como regiões de anelamento de primers, por exemplo).

Os contigs obtidos foram acrescentados a uma lista de sequências de regiões ITS do rDNA de outras linhagens fúngicas já estudadas, usando como referência outros trabalhos dedicados ao estudo da diversidade de *Purpureocillium* spp. (Carla Baron et al. 2020; Lotlikar et al. 2018; Niu et al. 2019). As sequências foram obtidas do banco de dados do NCBI, baseado na pesquisa do número de acesso de cada sequência selecionada. A lista preliminar de sequências (Tabela 3) foi então analisada utilizando-se o software Clustal Omega, para ser feito o alinhamento múltiplo das sequências de ITS (Sievers and Higgins 2014). As sequências de menor qualidade foram excluídas restando então um alinhamento contendo um total de 50 sequências (três dos isolados estudados neste trabalho e outras 47 usadas para construir a árvore filogenética). Após, o alinhamento obtido foi submetido ao software Wasabi Prank (Veidenberg and Löytynoja 2021) para seleção do modelo mais apropriado à análise filogenética. Por fim, o alinhamento final foi submetido ao software MEGA-X para construção de uma árvore filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood) (Yoshida and Nei 2016).

**Tabela 3.** Lista de sequências de ITS usadas nas análises filogenéticas. As sequências estão organizadas em ordem alfabética por espécie.

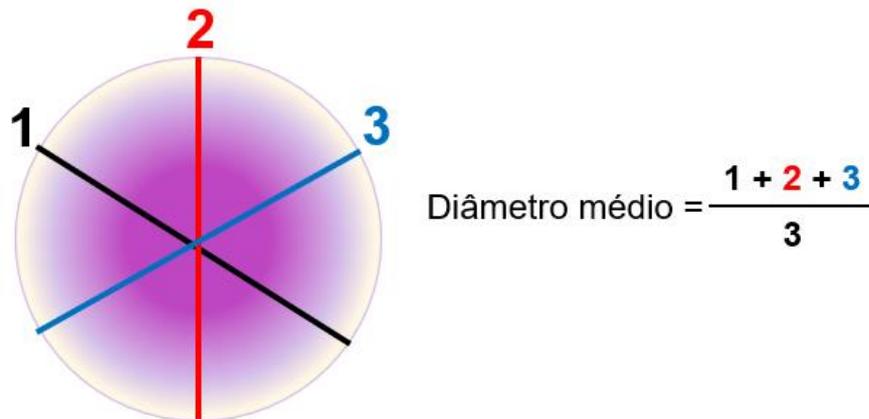
<b>Número de acesso</b>	<b>Espécie</b>
MH854802.1	<i>Beauveria bassiana</i>
HQ444271.1	<i>Beauveria bassiana</i>
MH859798.1	<i>Beauveria bassiana</i>
MH864708.1	<i>Cephalotrichum microsporium</i>
MH864739.1	<i>Clonostachys rosea</i>
NR 111169.1	<i>Cordyceps cateniannulata</i>
GU980041.1	<i>Cordyceps cylindrica</i>
GU734760.1	<i>Isaria cateniannulata</i>
AY624179.1	<i>Isaria farinosa</i>
HQ880828.1	<i>Isaria farinosa</i>
AY624182.1	<i>Isaria fumosorosea</i>
KU523252.1	<i>Isaria fumosorosea</i>
EU553334.1	<i>Isaria fumosorosea</i>
KM234213.1	<i>Isaria javanica</i>
DQ403723.1	<i>Isaria javanica</i>
GU980039.1	<i>Isaria takamizusanensis</i>
JN049846.1	<i>Lecanicillium psalliotae</i>
MH854923.1	<i>Metarhizium marquandii</i>
MH864440.1	<i>Metarhizium marquandii</i>
MH865781.1	<i>Metarhizium marquandii</i>
FR734105.1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
FR832490.1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
FR734101.1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
AY624193.1	<i>Paecilomyces marquandii</i>
FJ389930.1	<i>Paecilomyces variotii</i>
KF928455.1	<i>Phialophora verrucosa</i>
MH858477.1	<i>Pochonia chlamydosporia</i>
MH858871.1	<i>Pochonia chlamydosporia</i>
FR734106.1	<i>Purpureocillium lavendulum</i>
FR734107.1	<i>Purpureocillium lavendulum</i>
MH864976.1	<i>Purpureocillium lavendulum</i>
MH865347.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
MH865154.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
MH865301.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
MH855800.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>

HQ842824.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
HQ842816.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
HQ842822.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
HQ842823.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
HQ842817.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
HQ842818.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
HQ842812.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
HQ842836.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
HQ607867.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
KY951911.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
MH860557.1	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
AJ292397.1	<i>Verticillium chlamydosporium</i>

---

#### **4.4. Avaliação do espectro de temperaturas viáveis para o desenvolvimento de colônias dos isolados**

Em placas de meio MCc devidamente assinaladas com o número do isolado e a temperatura de incubação, 10 µL das suspensões de  $1 \times 10^8$  esporos por mL foram inoculados em triplicata em pontos equidistantes sobre o meio de cultura. Foram utilizadas temperaturas de 12, 22, 28 e 37 °C e feita a incubação durante um período de seis dias para avaliar a termotolerância de cada isolado. A 12 °C foi usada uma geladeira para incubar as placas, para as outras temperaturas foram usadas estufas. Foi escolhido o período de seis dias considerando o rápido crescimento de *Purpureocillium* spp.. Ao fim do período de cultivo foi feita a medição, utilizando régua, em centímetros do diâmetro de cada colônia em três eixos para quantificar seu crescimento. Por fim, foi calculado o diâmetro médio de cada colônia de cada isolado de *Purpureocillium* spp., em triplicata (Figura 11).



**Figura 11. Determinação do diâmetro médio de colônia.** Método usado para mediação do diâmetro em três eixos e fórmula do cálculo de diâmetro médio de colônia.

#### 4.5. Bioensaios em *Tenebrio molitor*

Suspensões de esporos de cada isolado foram preparadas e padronizadas a uma concentração de  $1 \times 10^8$  esporos por mL. Adicionalmente, 10  $\mu$ L das suspensões foram inoculados em tubos de ensaio estéreis contendo meio LB e assinalados para cada isolado, sendo mantidos em shaker de banho-maria a 37 °C por 24 h, essa validação é necessária para verificar a pureza das suspensões. Caso o meio estivesse límpido no dia seguinte seria evidência de que a suspensão estava livre de bactérias, caso contrário o meio estaria turvo como prova de contaminação.

As larvas de *T. molitor* utilizadas foram mantidas a uma temperatura de 4 °C até a realização do bioensaio sendo alimentadas com farelo de aveia a cada 7 dias. As larvas, em grupos de 15 indivíduos, foram imersas em 4 mL das suspensões de esporos de cada isolado, usando como recipiente Falcons estéreis de 50 mL de volume máximo. O tempo de imersão totalizou 30 segundos, sendo feita sob leve agitação para maximizar o contato das larvas com a suspensão de esporos. Após a imersão as larvas foram secas sobre papel filtro esterilizado em um funil de porcelana com sucção a vácuo, dentro de uma câmara fluxo estéril.

Após a secagem, as larvas foram dispostas em placas estéreis de plástico com papel filtro esterilizado umidificado com 500 µL de água destilada estéril. As placas com as larvas foram então incubadas em uma estufa a 28 °C. A água foi adicionada às placas em volumes de 500 µL diariamente, para favorecer o desenvolvimento do fungo. Foi feita a observação diária das larvas durante um período total de 14 dias. Um grupo de larvas não infectadas (imersas em água destilada estéril) foi mantido sob as mesmas condições durante um período equivalente para ser utilizado como grupo controle.

Foi procedida a contagem diária do número de indivíduos vivos e fazendo o decréscimo do número quando verificada a morte de insetos. Para diferenciar larvas mortas de larvas ainda vivas que estavam em estado de letargia (e assim, suspeitas de estarem mortas à primeira vista) foi feito um teste consistido em tocar rápida e levemente nas larvas com a ponta de uma pinça de metal estéril. Se as larvas demonstrassem qualquer reação na forma de movimento em resposta ao estímulo eram dadas como ainda vivas, e na ausência de movimento eram dadas como mortas. Também foi feita a verificação diária de sintomas visíveis e da capacidade motora dos espécimes vivos, bem como a presença de cadáveres de indivíduos mortos pelo respectivo isolado fúngico e de indícios de canibalismo. Larvas de *T. molitor* que iniciaram o processo de metamorfose durante o período deste experimento foram mantidas e incluídas na contagem.

Os indivíduos mortos foram visualizados em lupa para verificar o grau de dano aos seus corpos. Foram observados sintomas como hematomas e quaisquer estruturas fúngicas visíveis. Foi procurada também a presença de anomalias anatômicas nos indivíduos que passaram pelo processo de metamorfose, tendo o último sido completado ou não. No total foram realizados 34 bioensaios, um para cada um dos 34 isolados, além de 2 grupos controle, totalizando 36 grupos de insetos.

#### **4.6. Análises estatísticas**

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o software Graphpad Prism (versão 8.0.2). Foi utilizado Teste-T para verificar se os dados de termotolerância obtidos a 22 °C e 28 °C apresentavam diferença estatística

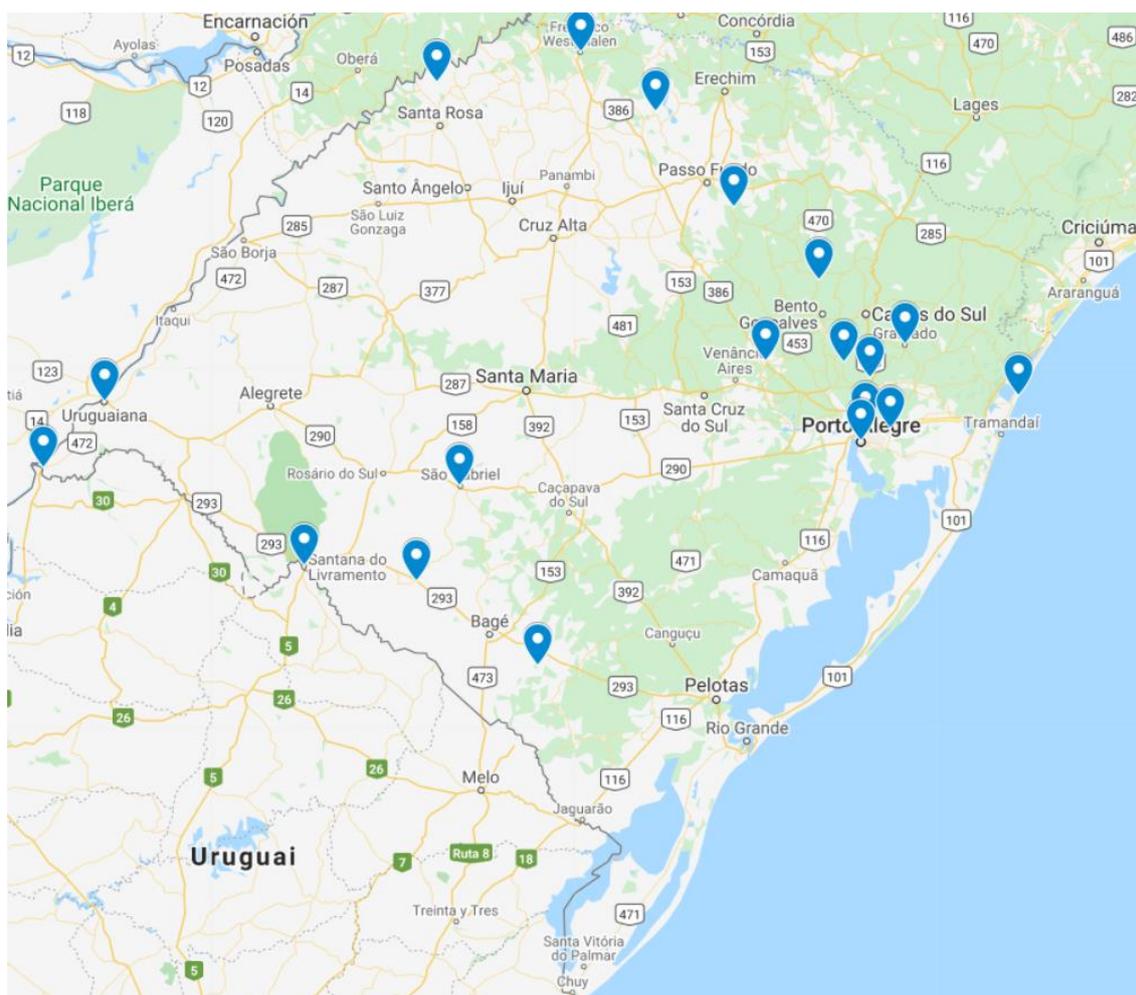
significativa. Os gráficos apresentados nos resultados foram produzidos com os softwares Graphpad Prism e Excel (versão 2019).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Descrição e ocorrência de *Purpureocillium* spp.

Os 34 isolados fúngicos estudados neste trabalho foram obtidos de 19 municípios do estado do RS. Os locais são indicados na Figura 18 e identificados na Tabela 1, abaixo. Pode-se ver que fungos do gênero *Purpureocillium* são amplamente distribuídos no Rio Grande do Sul, apesar das maiores ocorrências terem sido registradas nas regiões norte e sul do estado. A maior concentração de ocorrência foi registrada nos arredores da cidade de Porto Alegre, capital do RS. Esse fato, provavelmente, devido à maior amostragem de solos nessa região, sendo, portanto, um artefato.

A observação e descrição morfológica dos isolados foi condizente com as informações da literatura a respeito da morfologia do gênero *Purpureocillium* (Kepenekci et al. 2015; Perdomo et al. 2013; Schumacher et al. 2014). Entretanto, apesar das estruturas microscópicas (estrutura de hifas, corpos de frutificação e conídios) terem sido idênticas para todos os isolados, eles apresentaram variação quanto às estruturas macroscópicas, particularmente em relação à pigmentação de esporos (mais esbranquiçados ou mais escuros/arroxeados), padrões de coloração (se esta era homogênea ou se variava em anéis concêntricos ou em estrias radiais) e na coloração do reverso, que variou de amarela intensa a vermelha escura (Figura 11 da introdução e Figura 1 do anexo).



**Figura 12. Mapa dos pontos de coleta.** Os pontos indicam os municípios de origem dos isolados de fungos do gênero *Purpureocillium* estudados neste trabalho. Detalhes complementares na Tabela 4.

**Tabela 4.** Locais de coleta dos isolados de fungos do gênero *Purpureocillium*, de acordo com o número de isolados obtidos de cada município e identificação.

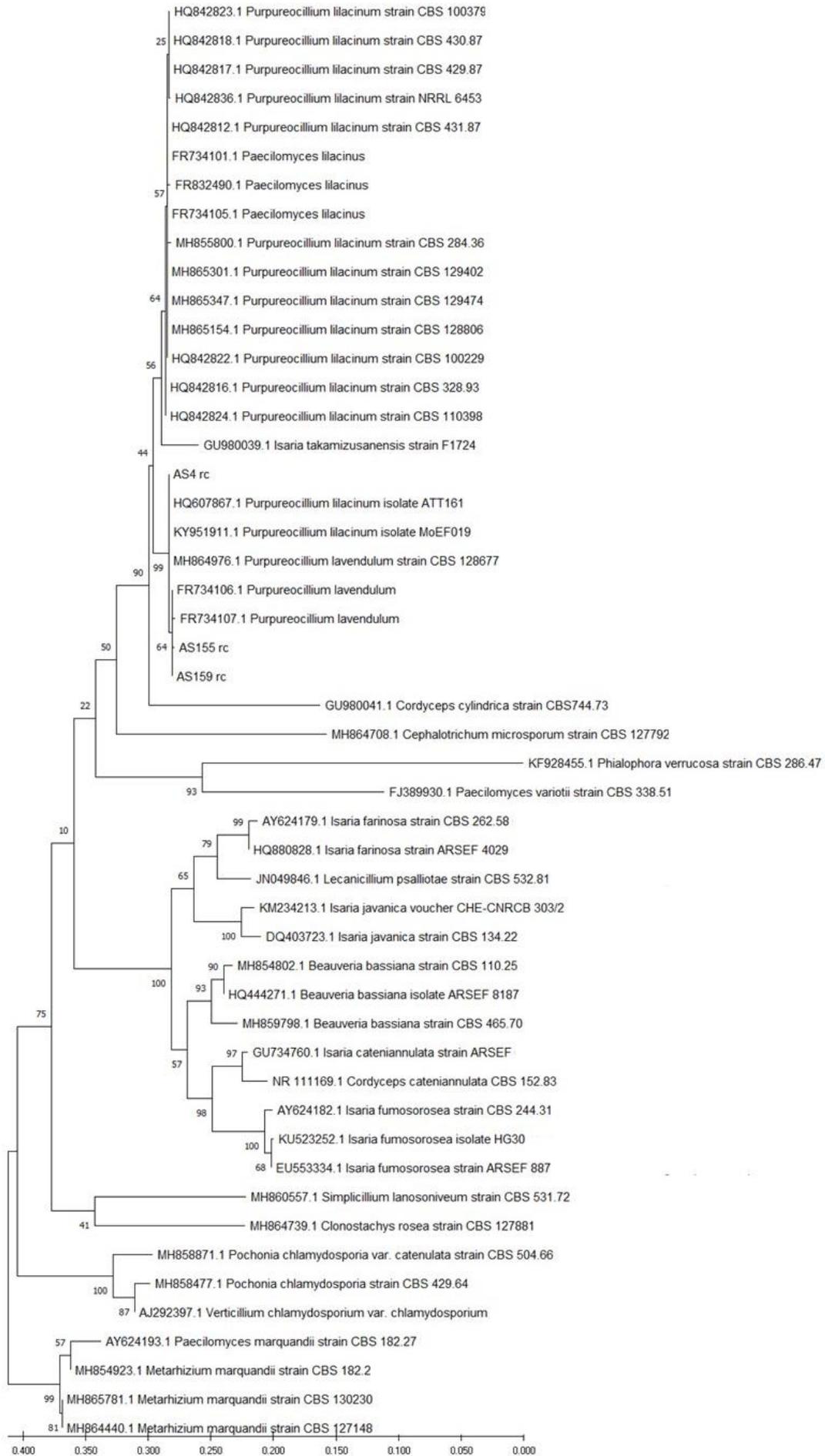
<b>Local de coleta (município)</b>	<b>Número de isolados obtidos</b>	<b>Identificação dos isolados</b>
<b>Esteio</b>	4	115, 118, 122, 128
<b>Candiota</b>	3	134, 142, 144
<b>Porto Alegre</b>	3	4, 244, 249
<b>Canoas</b>	2	20, 33
<b>Dom Pedrito</b>	2	194, 203
<b>Estrela</b>	2	80, 83
<b>Marau</b>	2	158, 159
<b>Santana do Livramento</b>	2	154, 155

<b>Uruguaiana</b>	2	222, 224
<b>Veranópolis</b>	2	286, 288
<b>Atlântida</b>	1	56
<b>Barra do Quaraí</b>	1	254
<b>Bom Princípio</b>	1	187
<b>Frederico Wesfalen</b>	1	94
<b>Gramado</b>	1	233
<b>Gravataí</b>	1	259
<b>Ivoti</b>	1	58
<b>Novo Machado</b>	1	202
<b>Ronda Alta</b>	1	150
<b>São Gabriel</b>	1	145

---

## 5.2. Resultados das análises de ITS

A análise filogenética baseada em ITS suportou a hipótese de que ambos os isolados AS155 e AS159 pertencem à espécie *P. lavendulum*. Para as outras sequências que compõem a árvore o código que precede o nome específico refere-se ao número de acesso da linhagem no banco de dados do NCBI e estas foram selecionadas com base em um artigo de diversidade de *Purpureocillium* (Carla Baron et al. 2020; Lotlikar et al. 2018; Niu et al. 2019).

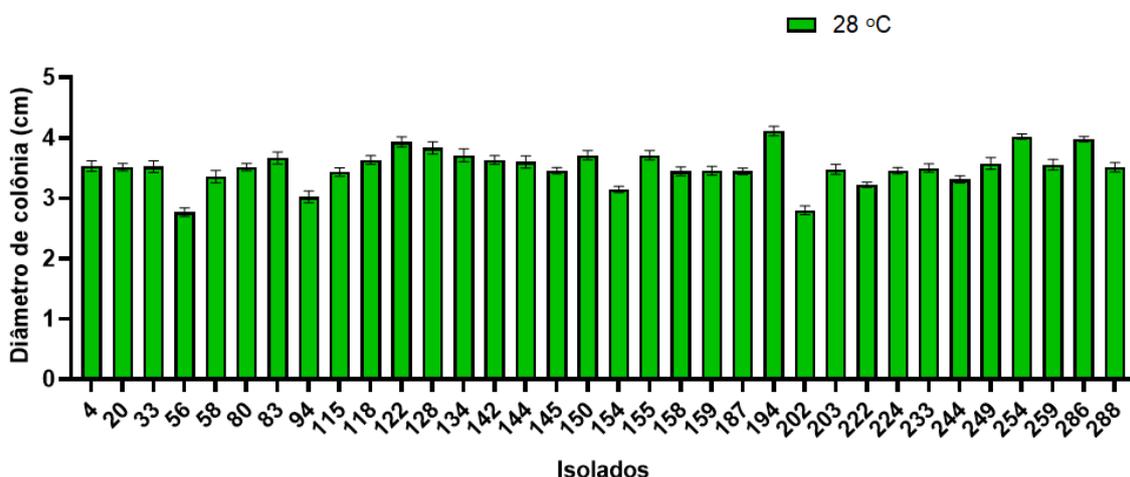


**Figura 13. Árvore filogenética.** Comparando sequências da região ITS do rDNA dos isolados AS4 (pertencente à espécie *P. lilacinum*, usado de referência ao gênero *Purpureocillium*), AS155 e AS159 (nos quais a sigla “rc” refere-se ao fato de que para estes foram usadas as respectivas sequências do complemento reverso) e de sequências provenientes de artigos de diversidade de FEPs (Carla Baron et al. 2020; Lotlikar et al. 2018; Niu et al. 2019).

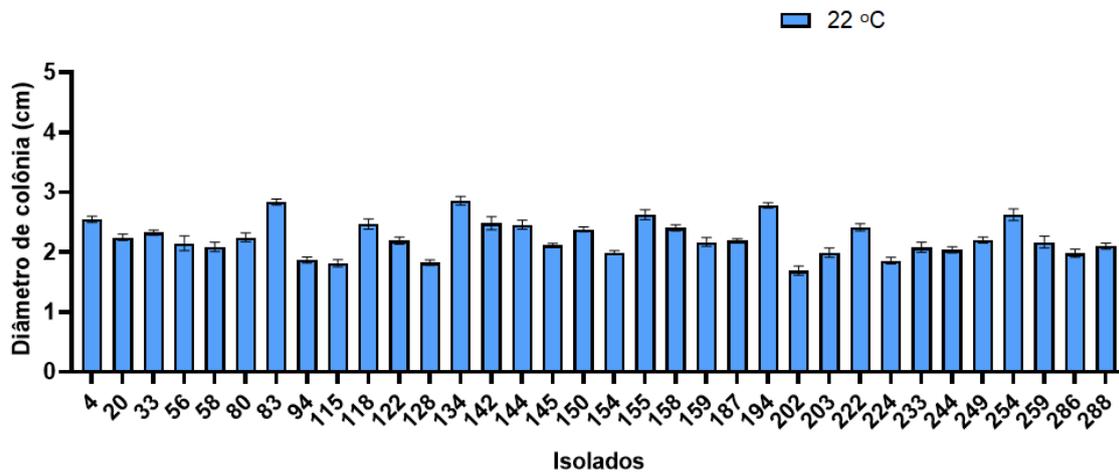
### 5.3. Resultados dos testes de termotolerância

Os isolados de *Purpureocillium* apresentaram discrepâncias significativas no diâmetro de suas colônias, sob todas as temperaturas de exposição. Todos os isolados apresentaram maior crescimento colonial a 28 °C. Sob as outras temperaturas houve redução do crescimento ou até ausência de colônias visíveis macroscopicamente. A 22 °C e a 37 °C foi observado menor do crescimento colonial e a 12 °C foi observada inibição total do crescimento. Mesmo dentro dos grupos expostos à mesma temperatura foi visto que os diferentes isolados de *P. lilacinum* atingiram diâmetros de colônias distintos, evidenciando a variação fenotípica dos isolados em relação à termotolerância.

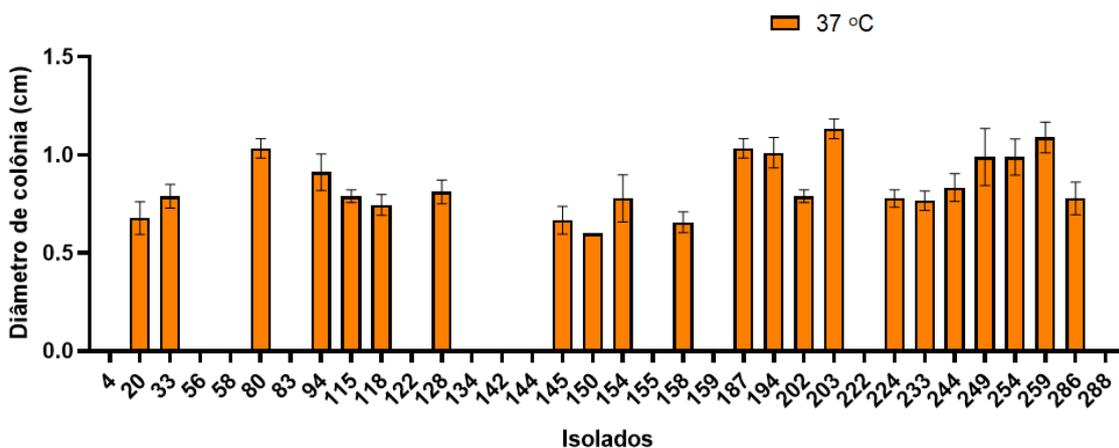
O grupo que apresentou a maior variação foi aquele exposto a 37 °C porque vários isolados não foram capazes de formar colônias adequadas para a medição do diâmetro (Figura 20). Assim, 12 isolados (35%) tiveram inibição total ou quase total do crescimento de colônia nesta temperatura. No eixo X dos gráficos (Figuras 14, 15, 16 e 17) estão os isolados fúngicos estudados neste experimento, ordenados em ordem crescente de identificação.



**Figura 14. Diâmetros médios de colônias a 28 °C.** Diâmetros médios de colônia de todos os isolados, quando expostos à temperatura de 28 °C durante um período de 6 dias.

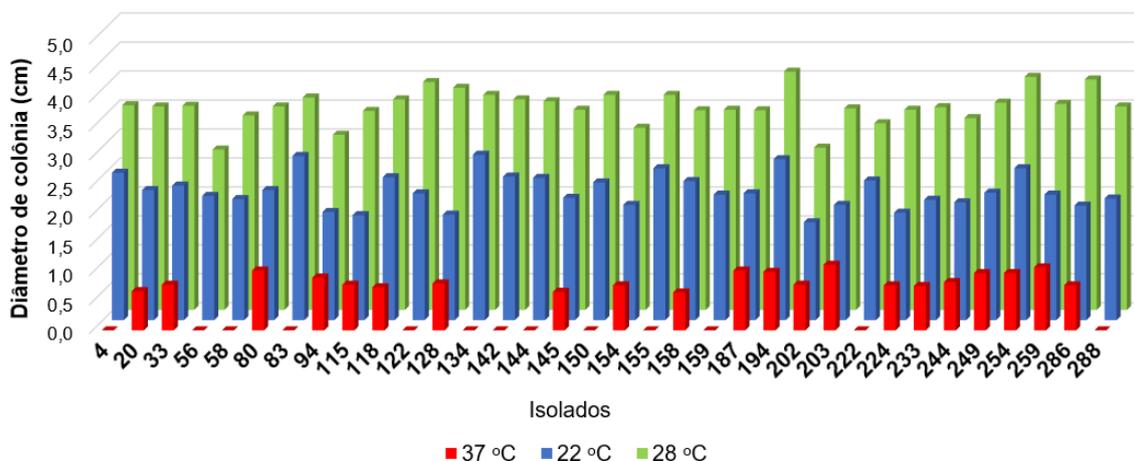


**Figura 15. Diâmetros médios de colônias a 22 °C.** Diâmetros médios de colônia de todos os isolados, quando expostos à temperatura de 22 °C durante um período de 6 dias.



**Figura 16. Diâmetros médios de colônias à 37 °C.** Diâmetros médios de colônia (em cm) de todos os isolados, quando expostos à temperatura de 37 °C durante um período de 6 dias.

### Resultados dos testes de termotolerância



**Figura 17. Resultados gerais dos testes de termotolerância.**

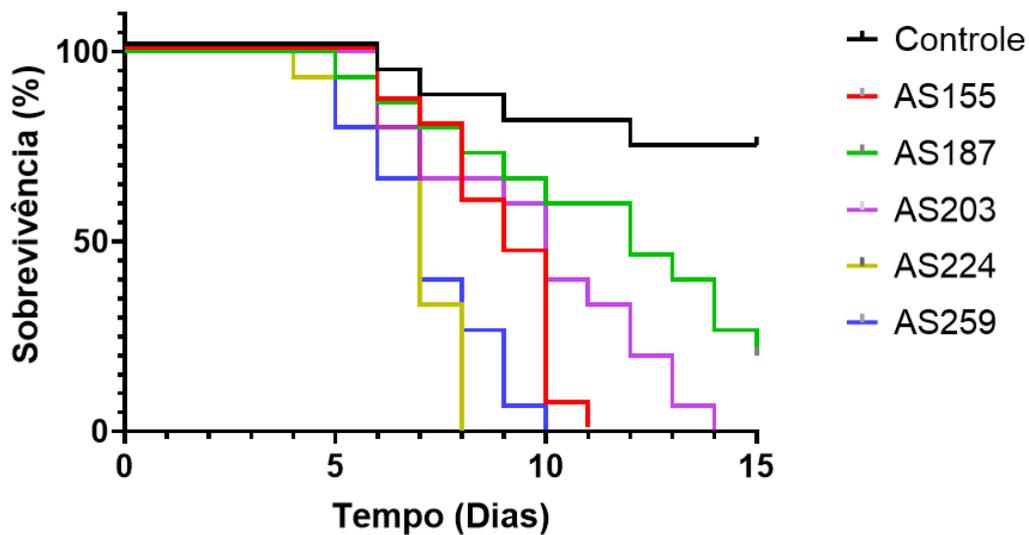
Combinação dos três gráficos anteriores (figuras 14, 15 e 16) mostrando os diâmetros médios de colônia de cada isolado sob cada temperatura, organizados em ordem crescente de acordo com o número de identificação de cada isolado.

O gráfico do grupo exposto à temperatura de 12 °C não consta. Isso se deve ao fato de que nenhum dos isolados de *Purpureocillium* foi capaz de se desenvolver o bastante para formar colônias visíveis quando expostos a esta temperatura no período deste experimento.

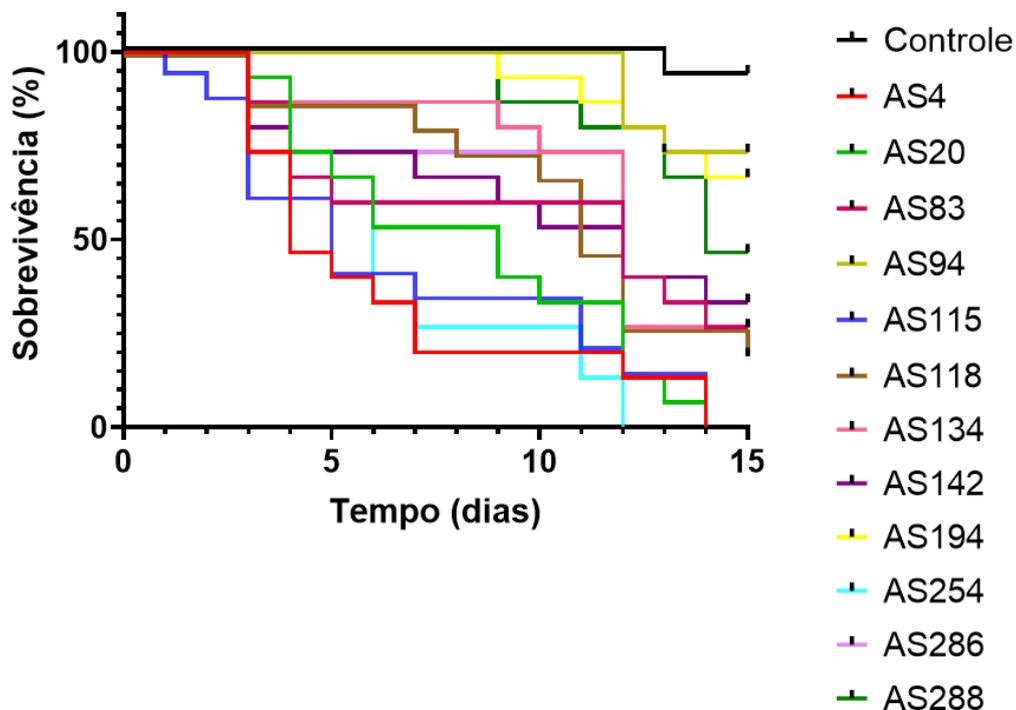
#### 5.4. Resultados dos bioensaios em *Tenebrio molitor*

Os bioensaios mostraram que, majoritariamente, o LT50 dos isolados foi de 12 dias após infecção. Dentre as linhagens testadas os isolados AS4, AS115, AS224, AS254 e AS259 se mostraram os mais virulentos, por terem apresentado os valores de LT50 mais curtos. O isolado AS4 apresentou um LT50 de 5 dias, o AS115 um LT50 de 6 dias, o AS224 e o AS254 um LT50 de 7 dias e AS259 um LT50 de 6 dias. Na maioria dos grupos, tanto tratamentos quanto controles, foram observados casos de canibalismo entre as larvas. Nos grupos controle todas as mortes registradas se deram por canibalismo. Os gráficos de sobrevivência (Figuras 18 e 19) foram plotados separadamente, pois os respectivos bioensaios foram realizados em tempos diferentes. Foram

consideradas tanto as mortes atribuídas à infecção pelos isolados quanto as atribuídas ao canibalismo.



**Figura 18. Gráficos de sobrevivência do primeiro bioensaio.** Foram testados cinco isolados mais um grupo controle, a contagem de insetos ainda vivos feita ao longo de 15 dias com a sobrevivência quantificada em termos de porcentagem.



**Figura 19. Gráficos de sobrevivência do segundo bioensaio.** Foram testados 12 isolados mais um grupo controle, a contagem de insetos ainda vivos feita ao longo de 15 dias com a sobrevivência quantificada em termos de porcentagem.

## 6. DISCUSSÃO

Todos os isolados apresentaram estruturas e morfologia, tanto macro quanto microscópica, condizentes com as características típicas do gênero *Purpureocillium* descritas na literatura (Kepenekci et al. 2015; Perdomo et al. 2013; Schumacher et al. 2014). Apesar de ter sido observada variação de algumas características, tais como pigmentação dos esporos e coloração do reverso, a descrição dos isolados foi consistente com as características típicas do gênero *Purpureocillium*.

*P. lilacinum* é comumente isolado do solo, vegetação em decomposição, insetos, nematóides e como contaminante de laboratório. É também um patógeno oportunista em seres humanos e outros vertebrados (Luangsa-Ard et al. 2011). *P. lilacinum* é altamente adaptável quanto a sua estratégia de sobrevivência na natureza, pois dependendo da disponibilidade de nutrientes, pode se comportar como entomopatógeno, micoparasita, saprófito ou nematófago (Medeiros et al. 2018). Tamanha flexibilidade comportamental faz o com que este fungo tenha múltiplos potenciais biotecnológicos. Seu papel como nematófago, por exemplo, permitiu sua aplicação como agente de controle de nematoides fitoparasitas já há vários anos (Dahlin et al. 2019; Silva 2011).

Assim como o restante do gênero *Purpureocillium*, *P. lavendulum* foi apenas recentemente estabelecido como espécie (Perdomo et al. 2013). Similarmente a *P. lilacinum*, *P. lavendulum* é um fungo nematófago encontrado no solo de regiões agrícolas de clima subtropical, geralmente nas mesmas condições ambientais que o primeiro, apesar de ter ocorrência muito menos frequente, o que se manifesta no fato do número de isolados de *P. lavendulum* serem relativamente raros (Liu et al. 2019). A principal diferença entre ambas espécies se dá pelo fato de *P. lavendulum* não ter relatos de patogenicidade a seres humanos, o que se deve, entre outros fatores, à incapacidade de *P. lavendulum* de tolerar temperaturas acima de 35 °C, ao passo que *P. lilacinum* apresenta crescimento sob temperaturas de até 38 °C (Kepenekci et al. 2015; Liu et al. 2019). Assim, *P. lavendulum* apresenta baixa relevância clínica e, portanto, tem potencial como um agente de controle biológico mais seguro à saúde humana. Outra diferença entre essas espécies é que, o reverso das

colônias de *P. lilacinum* geralmente é incolor ou avermelhado, enquanto que o reverso *P. lavendulum* frequentemente é amarelado (Luangsa-Ard et al. 2011; Perdomo et al. 2013).

Fungos entomopatogênicos possuem diversos mecanismos moleculares para lidar com o estresse causado pela exposição a altas temperaturas. Os melhores exemplos são a produção de chaperonas e de proteínas de choque térmico, as quais medeiam as respostas fisiológicas do fungo tanto a altas temperaturas quanto a variações térmicas (Liao et al. 2014).

A temperatura do ambiente em conjunto com a radiação solar e o comportamento térmico do hospedeiro são centrais à compreensão das interações patógeno-hospedeiro, particularmente no caso da interação entre FEPs e artrópodes (O and N 2015). Consequentemente, estes fatores levam a variações tanto no período latente de infecção quanto na taxa de sobrevivência do hospedeiro artrópode ao longo e entre estações devido à influência da temperatura sobre a virulência do fungo (Bernardo et al. 2020). Em alguns casos, inclusive, foi relatado que artrópodes alteram seu comportamento não devido à infecção, mas como mecanismo de defesa contra FEPs, como no caso do gafanhoto-do-deserto (*Schistocerca gregaria*) que, quando infectado por *Metarhizium acridum*, expõe seu corpo à luz solar para elevar sua temperatura corporal com o ímpeto de eliminar os esporos do fungo (Blanford and Thomas 1999).

Uma observação importante pode ser feita dos resultados do teste de termotolerância a 37 °C. Os isolados que não formaram colônias a essa temperatura têm potencial como agentes de biocontrole mais seguros, pois apesar de terem menor resistência a altas temperaturas, assim tendo sua aplicação restrita a regiões de clima mais frio, eles provavelmente não ofereceria risco de infecção a seres humanos por não tolerarem a temperatura fisiológica do organismo humano.

A maioria dos estudos filogenéticos das espécies do gênero *Purpureocillium* ainda apresentam lacunas. A principal razão para a proposta do novo gênero *Purpureocillium* foi o fato de que o gênero antecessor, *Paecilomyces*, é polifilético em duas subclasses, Sordariomycetidae e Eurotiomycetidae (Luangsa-Ard, Hywel-Jones, and Samson 2004). O novo gênero foi proposto para acomodar a espécie *Paecilomyces lilacinus*, que fora

renomeada *Purpureocillium lilacinum* (Luangsa-Ard et al. 2011). Além disso, os isolados de *P. lilacinum* examinados agrupam-se em dois clados baseados em ITS e sequências parciais de TEF. As sequências ITS e TEF dos isolados de *P. lilacinum* usados para o biocontrole de pragas de nematóides são idênticas às que causam infecções em humanos (Prasad, Varshney, and Adholeya 2015).

Dos 34 isolados fúngicos pertencentes ao gênero *Purpureocillium* estudados neste trabalho, 17 (50%) foram testados nos bioensaios, para verificar se estes apresentam patogenicidade contra *T. molitor*. Não foi possível testar todos os isolados devido às restrições impostas pelas medidas de combate à pandemia da Covid-19. Todos os isolados apresentaram patogenicidade contra as larvas de *T. molitor*. Porém foi observada significativa variação no grau de virulência dos isolados. A probabilidade de morte de um artrópode é proporcional à concentração de UFCs do FEP a qual o hospedeiro é exposto (Butt 2000). Baseado nessa constatação que a concentração de  $1 \times 10^8$  esporos por mL foi escolhida, para se ter certeza de *P. lilacinum* conseguisse apresentar patogenicidade contra *T. molitor*.

*P. lilacinum* já foi considerado o fungo com maior potencial para aplicação como agente de controle biológico de nematóides fitoparasitas em solos de regiões agrícolas de clima tropical e subtropical, devido à sua notável atividade nematicida (Morgan-Jones, White, and Rodriguez-Kabana 1984). Porém, *P. lilacinum* é um patógeno humano oportunista capaz de infectar a pele, pulmões e olhos de indivíduos imunocomprometidos. Sua patogenicidade contra seres humanos, ainda que de rara documentação, oferece mais um obstáculo a seu uso disseminado como agente de controle biológico (Esser and El-Gholl 1993).

Para contornar o empecilho da patogenicidade de *P. lilacinum* contra seres humanos, aqui são propostas duas estratégias. Primeiro: avaliar a literatura a respeito de outras espécies do gênero *Purpureocillium*, tais como *P. lavendulum*, para verificar se as mesmas apresentam patogenicidade a nematóides fitoparasitas ou artrópodes, mas não a seres humanos. Segundo: prospectar isolados de *P. lilacinum* incapazes de crescer sob temperaturas próximas de 37 °C, que seriam menos eficazes como agentes controle biológico em locais de clima quente, mas que em compensação provavelmente não ofereceria risco de patogenicidade a seres humanos.

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os isolados AS155 e AS159, os quais tiveram suas regiões ITS sequenciadas e posteriormente submetidas a análises filogenéticas, pertencem à espécie *P. lavendulum*. Os isolados apresentaram maior crescimento a 28 °C, sendo a temperatura ideal de crescimento de *Purpureocillium* spp., além de ter sido observada heterogeneidade fenotípica quanto à capacidade destes de crescerem a 37 °C. Os isolados AS4, AS115, AS224, AS254 e AS259 se mostraram os mais virulentos, por terem apresentado os menores valores de LT50 e sendo assim os mais letais. Estes, portanto, apresentaram maior potencial para bioensaios futuros, como candidatos para testes de patogenicidade contra a lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*. Os resultados obtidos neste trabalho auxiliarão na melhor descrição do gênero *Purpureocillium*, permitindo a compreensão da distribuição ambiental e de seus nichos ecológicos, bem como, melhor compreender o potencial biotecnológico destes fungos.

Como perspectivas futuras, estão incluídas:

- Prosseguir com os bioensaios em *T. molitor*, para verificar a patogenicidade a artrópodes dos isolados restantes;
- Selecionar os isolados mais virulentos para bioensaios usando a lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*);
- A realização de testes a fim de avaliar a resistência dos isolados a radiação UV;
- O sequenciamento da região rDNA-ITS de mais isolados, para fins de identificação de espécie.

## 8. Referências

- Ansari, M. A., S. Vestergaard, L. Tirry, and M. Moens. 2004. "Selection of a Highly Virulent Fungal Isolate, *Metarhizium Anisopliae* CLO 53, for Controlling *Hoplia Philanthus*." *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Arai, Tadashi, Yuzuru Mikami, Kazutaka Fukushima, Takehiko Utsumi, and Katsukiyo Yazawa. 1973. "A New Antibiotic, Leucinostatin, Derived from *Penicillium Lilacinum*." *The Journal of Antibiotics*.

- Barelli, Larissa, Soumya Moonjely, Scott W. Behie, and Michael J. Bidochka. 2016. "Fungi with Multifunctional Lifestyles: Endophytic Insect Pathogenic Fungi." *Plant Molecular Biology* 90(6):657–64.
- Baron, Noemi Carla, Everlon Cid Rigobelo, and Diego Cunha Zied. 2019. "Filamentous Fungi in Biological Control: Current Status and Future Perspectives." *Chilean Journal of Agricultural Research* 79(2):307–15.
- Behie, S. W., P. M. Zelisko, and M. J. Bidochka. 2012. "Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants." *Science*.
- Behie, Scott W., and Michael J. Bidochka. 2014a. "Nutrient Transfer in Plant-Fungal Symbioses." *Trends in Plant Science*.
- Behie, Scott W., and Michael J. Bidochka. 2014b. "Ubiquity of Insect-Derived Nitrogen Transfer to Plants by Endophytic Insect-Pathogenic Fungi: An Additional Branch of the Soil Nitrogen Cycle." *Applied and Environmental Microbiology*.
- Bernardo, Cíntia das Chagas, Ronaldo Alves Pereira-Junior, Christian Luz, Gabriel Moura Mascarin, and Éverton Kort Kamp Fernandes. 2020. "Differential Susceptibility of Blastospores and Aerial Conidia of Entomopathogenic Fungi to Heat and UV-B Stresses." *Fungal Biology* 124(8):714–22.
- Blanford, Simon, and Matthew B. Thomas. 1999. "Host Thermal Biology: The Key to Understanding Host–Pathogen Interactions and Microbial Pest Control?" *Agricultural and Forest Entomology* 1(3):195–202.
- Bu'Lock, J. D. 1961. "Intermediary Metabolism and Antibiotic Synthesis." *Advances in Applied Microbiology*.
- Buriol, Galileo Adeli, Valduino Estefanel, Álvaro Chagas de Chagas, and Denise Eberhardt. 2007. "CLIMA E VEGETAÇÃO NATURAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL SEGUNDO O DIAGRAMA CLIMÁTICO DE WALTER E LIETH ." *Ciência Florestal* 17:91–100.
- Butt, T. M., C. J. Coates, I. M. Dubovskiy, and N. A. Ratcliffe. 2016. *Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions*. Vol. 94.
- Butt, Tariq. 2000. "Bioassays of Entomogenous Fungi." Pp. 141–95 in Calvillo-Medina, Rosa Paulina, Diana Gabriela Ponce-Angulo, Tania

- Raymundo, Carlos Adolfo Müller-Morales, Efraín Escudero-Leyva, Juan Campos Guillén, and Victor Manuel Bautista-de Lucio. 2021. "Purpureocillium Roseum Sp. Nov. A New Ocular Pathogen for Humans and Mice Resistant to Antifungals." *Mycoses* 64(2):162–73.
- Calvo, Ana M., Richard A. Wilson, Jin Woo Bok, and Nancy P. Keller. 2002. "Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
- Carla Baron, Noemi, Andressa De Souza Pollo, and Everlon Cid Rigobelo. n.d. "Purpureocillium Lilacinum and Metarhizium Marquandii as Plant Growth-Promoting Fungi."
- Cavello, Ivana A., Juan M. Crespo, Sabrina S. García, José M. Zapiola, María F. Luna, and Sebastián F. Cavalitto. 2015. "Plant Growth Promotion Activity of Keratinolytic Fungi Growing on a Recalcitrant Waste Known as (Hair Waste)."
- Ceci, Andrea, Veronica Spinelli, Lorenzo Massimi, Silvia Canepari, and Anna Maria Persiani. 2020. "Fungi and Arsenic: Tolerance and Bioaccumulation by Soil Saprotrophic Species." *Applied Sciences (Switzerland)*.
- Cruz, Ivan. 2002. "Manejo Da Resistência de Insetos-Praga a Inseticidas, Com Ênfase Em Spodoptera Frugiperda (Smith)." *Embrapa Documentos* 15.
- D'Alessandro, Walmirton B., Richard A. Humber, and Christian Luz. 2012. "Occurrence of Pathogenic Fungi to Amblyomma Cajennense in a Rural Area of Central Brazil and Their Activities against Vectors of Rocky Mountain Spotted Fever." *Veterinary Parasitology* 188(1–2):156–59.
- Dahlin, Paul, Reinhard Eder, Erika Consoli, Jürgen Krauss, and Sebastian Kiewnick. 2019. "Integrated Control of Meloidogyne Incognita in Tomatoes Using Fluopyram and Purpureocillium Lilacinum Strain 251." *Crop Protection* 124:104874.
- Damalas, Christos A., and Ilias G. Eleftherohorinos. 2011. "Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8(5):1402–19.
- Day, Roger, Phil Abrahams, Melanie Bateman, Tim Beale, Victor Clottey, Matthew Cock, Yelitza Colmenarez, Natalia Corniani, Regan Early, Julien Godwin, Jose Gomez, Pablo Gonzalez Moreno, and Sean T. Murphy. 2017. "Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. Outlooks on

- Pest Management.” *Outlooks on Pest Management* 28(5):196–201.
- Eberhard, William, Jessica Pacheco-Esquivel, Farah Carrasco-Rueda, Yuliana Christopher, Cely Gonzalez, Daniel Ramos, Hector Urbina, and Meredith Blackwell. 2014. “Zombie Bugs? The Fungus *Purpureocillium* Cf. *Lilacinum* May Manipulate the Behavior of Its Host Bug *Edessa Rufomarginata*.” *Mycologia*.
- Ek-Ramos, María J., Wenqing Zhou, César U. Valencia, Josephine B. Antwi, Lauren L. Kalns, Gaylon D. Morgan, David L. Kerns, and Gregory A. Sword. 2013. “Spatial and Temporal Variation in Fungal Endophyte Communities Isolated from Cultivated Cotton (*Gossypium Hirsutum*).” *PLoS ONE*.
- Esser, R. P., and N. E. El-Gholl. 1993. *Paecilomyces Lilacinus, a Fungus That Parasitizes Nematode Eggs*. Florida Department of Agriculture & Consumer Services.
- Evans, Harry C., Simon L. Elliot, and David P. Hughes. 2011. “*Ophiocordyceps Unilateralis*.” *Communicative and Integrative Biology*.
- Faria, Marcos R. d., and Stephen P. Wraight. 2007. “Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Classification of Formulation Types.” *Biological Control*.
- Fenice, M., L. Selbmann, R. Di Giambattista, and F. Federici. 1998. “Chitinolytic Activity at Low Temperature of an Antarctic Strain (A3) of *Verticillium Lecanii*.” *Research in Microbiology*.
- Fernandes, Éverton K. K., Drauzio E. N. Rangel, Gilberto U. L. Braga, and Donald W. Roberts. 2015. “Tolerance of Entomopathogenic Fungi to Ultraviolet Radiation: A Review on Screening of Strains and Their Formulation.” *Current Genetics* 61(3):427–40.
- Gao, Qiang, Kai Jin, Sheng Hua Ying, Yongjun Zhang, Guohua Xiao, Yanfang Shang, Zhibing Duan, Xiao Hu, Xue Qin Xie, Gang Zhou, Guoxiong Peng, Zhibing Luo, Wei Huang, Bing Wang, Weiguo Fang, Sibao Wang, Yi Zhong, Li Jun Ma, Raymond J. St. Leger, Guo Ping Zhao, Yan Pei, Ming Guang Feng, Yuxian Xia, and Chengshu Wang. 2011. “Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium Anisopliae* and *M. Acridum*.” *PLoS Genetics*.

- Goffré, D., and P. J. Folgarait. 2015. "Purpureocillium Lilacinum, Potential Agent for Biological Control of the Leaf-Cutting Ant *Acromyrmex Lundii*." *Journal of Invertebrate Pathology* 130:107–15.
- Gupta, Subhash C., Timothy D. Leathers, and Donald T. Wicklow. 1993. "Hydrolytic Enzymes Secreted by *Paecilomyces Lilacinus* Cultured on Sclerotia of *Aspergillus Flavus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Hallman, G. 1979. "Importancia de Algunas Relaciones Naturales Plantas-Artropodos En La Agricultura de La Zona Calida Del Tolima Central." *Revista Colombiana de Entomologia* 5(3–4):19–26.
- Holder, Diane J., and Nemat O. Keyhani. 2005. "Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria (Cordyceps) Bassiana* to Substrata." *Applied and Environmental Microbiology*.
- Hotaka, Dararat, Alongkorn Amnuaykanjanasin, Chan Maketon, Siraprapa Siritutsoontorn, and Monchan Maketon. 2015. "Efficacy of *Purpureocillium Lilacinum* CKPL-053 in Controlling Thrips Palmi (Thysanoptera: Thripidae) in Orchid Farms in Thailand." *Applied Entomology and Zoology*.
- Hu, Xiao, Guohua Xiao, Peng Zheng, Yanfang Shang, Yao Su, Xinyu Zhang, Xingzhong Liu, Shuai Zhan, Raymond J. St. Leger, and Chengshu Wang. 2014. "Trajectory and Genomic Determinants of Fungal-Pathogen Speciation and Host Adaptation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Ignoffo, C. M., and C. Garcia. 1992. "Influence of Conidial Color on Inactivation of Several Entomogenous Fungi (Hyphomycetes) by Simulated Sunlight." *Environmental Entomology*.
- Inglis, Peter W., and Myrian S. Tigano. 2006. "Identification and Taxonomy of Some Entomopathogenic *Paecilomyces* Spp. (Ascomycota) Isolates Using rDNA-ITS Sequences." *Genetics and Molecular Biology* 29(1):132–36.
- Jaber, Lara R., and Bonnie H. Ownley. 2018. "Can We Use Entomopathogenic Fungi as Endophytes for Dual Biological Control of Insect Pests and Plant Pathogens?" *Biological Control* 116:36–45.
- Jorge, Felipe Vanhoni, and Francisco De Assis Mendonça. 2017. "O Clima Da Fachada Atlântica Sul Do Brasil: Atualização Introdutória." *Revista Brasileira de Climatologia* 5.
- Keller, Nancy P. 2019. "Fungal Secondary Metabolism: Regulation, Function

- and Drug Discovery.” *Nature Reviews Microbiology*.
- Kepenekci, İlker, B. İnal, T. Atay, and A. Yeşilayer. 2015. “Pathogenicity of the Entomopathogenic Fungus, *Purpureocillium Lilacinum* Tr1 against the Black Cherry Aphid, *Myzus Cerasi* Fabricus (Hemiptera: Aphididae).” *Munis Entomology and Zoology* 10(1):53–60.
- Kepenekci, E. Oksal, H. D. Saglam, T. Atay, A. Tulek, and E. Evlice. 2015. “Identification of Turkish Isolate of the Entomopathogenic Fungi, *Purpureocillium Lilacinum* (Syn: *Paecilomyces Lilacinus*) and Its Effect on Potato Pests, *Phthorimaea Operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Leptinotarsa Decemlineata* (Say) (Coleo.” *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 25(1):121–27.
- Khan, Alamgir, Keith Williams, and Helena Nevalainen. 2003. “Testing the Nematophagous Biological Control Strain *Paecilomyces Lilacinus* 251 for Paecilotoxin Production.” *FEMS Microbiology Letters*.
- Liao, Xinggang, Hsiao-Ling Lu, Weiguo Fang, and Raymond J. St Leger. 2014. “Overexpression of a *Metarhizium Robertsii* HSP25 Gene Increases Thermotolerance and Survival in Soil.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(2):777–83.
- Liu, Lu, Yan Ru Cao, Chen Chen Zhang, Hai Feng Fan, Zhi Yi Guo, He Yu Yang, Mi Chen, Jing Jing Han, Jianping Xu, Ke Qin Zhang, and Lian Ming Liang. 2019. “An Efficient Gene Disruption System for the Nematophagous Fungus *Purpureocillium Lavendulum*.” *Fungal Biology* 123(4):274–82.
- Lotlikar, Nikita P., and Samir R. Damare. 2018. “Variability in Protein Expression in Marine-Derived *Purpureocillium Lilacinum* Subjected to Salt and Chromium Stresses.” *Indian Journal of Microbiology* 58(3):360–71.
- Lotlikar, Nikita P., Samir R. Damare, Ram Murti Meena, P. Linsy, and Brenda Mascarenhas. 2018. “Potential of Marine-Derived Fungi to Remove Hexavalent Chromium Pollutant from Culture Broth.” *Indian Journal of Microbiology* 58(2):182–92.
- Luangsa-Ard, J. Jennifer, Nigel L. Hywel-Jones, and Robert A. Samson. 2004. “The Polyphyletic Nature of *Paecilomyces* Sensu Lato Based on 18S-Generated rDNA Phylogeny.” *Mycologia* 96(4):773–80.
- Luangsa-Ard, Jennifer, Jos Houbraken, Tineke Van Doorn, Seung-Beom Hong, Andrew M. Borman, Nigel L. Hywel-Jones, and Robert A. Samson. n.d.

“Purpureocillium, a New Genus for the Medically Important Paecilomyces Lilacinus.”

- Madariaga-Mazón, Abraham, Martín González-Andrade, María Del Carmen González, Anthony E. Glenn, Carlos M. Cerda-García-Rojas, and Rachel Mata. 2013. “Absolute Configuration of Acremoxanthone C, a Potent Calmodulin Inhibitor from Purpureocillium Lilacinum.” *Journal of Natural Products*.
- Medeiros, Fabíola Rodrigues, Raimunda Nonata Santos de Lemos, Antonia Alice Costa Rodrigues, Antonio Batista Filho, Leonardo de Jesus Machado Gois de Oliveira, and José Ribamar Gusmão Araújo. 2018. “Occurrence of Purpureocillium Lilacinum in Citrus Black Fly Nymphs .” *Revista Brasileira de Fruticultura* 40.
- Mendoza, A. R., R. A. Sikora, and S. Kiewnick. 2007. “Influence of Paecilomyces Lilacinus Strain 251 on the Biological Control of the Burrowing Nematode Radopholus Similis in Banana.” *Nematropica* 37(2):203–13.
- Miao, Tianjin, Song Gao, Shengwei Jiang, Guoshi Kan, Pengju Liu, Xianming Wu, Yingfeng An, and Shuo Yao. 2014. “A Method Suitable for DNA Extraction from Humus-Rich Soil.” *Biotechnology Letters* 36(11):2223–28.
- Moazami, Nasrin. 2019. *Biological Control*. Vol. 3. Third Edit. Elsevier.
- Montezano, D. G., A. Specht, D. R. Sosa-Gómez, V. F. Roque-Specht, J. C. Sousa-Silva, S. V. Paula-Moraes, J. A. Peterson, and T. E. Hunt. 2018. “Host Plants of Spodoptera Frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas .” *African Entomology* 26(2):286–300.
- Morgan-Jones, G., J. F. White, and R. Rodriguez-Kabana. 1984. “Phytonematode Pathology: Ultrastructural Studies. II. Parasitism of Meloidogyne Arenaria Eggs and Larvae by Paecilomyces Lilacinus.” *Nematropica* 57–71.
- Nascimento, Érika, Sergio H. Da Silva, Everaldo Dos Reis Marques, Donald W. Roberts, and Gilberto U. L. Braga. 2010. “Quantification of Cyclobutane Pyrimidine Dimers Induced by UVB Radiation in Conidia of the Fungi Aspergillus Fumigatus, Aspergillus Nidulans, Metarhizium Acridum and Metarhizium Robertsii.” *Photochemistry and Photobiology*.
- Niu, Xiaoyan, Weiwen Xie, Jing Zhang, and Qiongbo Hu. 2019. “Biodiversity of

- Entomopathogenic Fungi in the Soils of South China.” *Microorganisms* 7(9).
- O, A. Borisade, and Magan N. 2015. “Resilience and Relative Virulence of Strains of Entomopathogenic Fungi under Interactions of Abiotic Stress.” *African Journal of Microbiology Research* 9(14):988–1000.
- Oggerin, Monike, Nuria Rodr, and Ricardo Amils. 2014. “Fungal Jarosite Biomineralization in R í o Tinto.” 165:719–25.
- Oliveira, Márcia Cristina De Sena, Luciana Correia De Almeida Regitano, Alexandre Dinnys Roese, Denilson Gouvêa Anthonisen, Epaminondas Patocíniio, Sandra Maria Mansur Parma, Scagliusi, Wilston Henrique Belem Timóteo, and Silvia Neto Jardim. 2007. “Fundamentos Teórico-Práticos e Protocolos de Extração e de Amplificação de Dna Por Meio Da Técnica de Reação Em Cadeia Da Polimerase.” *Embrapa Pecuária Sudeste* 43.
- Ortiz-Urquiza, Almudena, and Nemat O. Keyhani. 2015. “Stress Response Signaling and Virulence: Insights from Entomopathogenic Fungi.” *Current Genetics*.
- Pandey, Piyush, and Michael Henry. 2019. “Md Tofazzal Islam · M . Mahfuz Rahman Bacilli and Agrobiotechnology : Phytostimulation and Biocontrol.” (October).
- Park, J., J. R. Hargreaves, E. J. Mcconville, G. R. Stirling, E. L. Ghisalberti, and K. Sivasithamparam. 2004. “Production of Leucinostatins and Nematicidal Activity of Australian Isolates of Paecilomyces Lilacinus ( Thom ) Samson.” (Table 1):271–76.
- Perdomo, Haybrig, Josep Cano, Dania García, Josepa Gené, Margarita Hernández, and Josep Guarro. 2013. “Polyphasic Analysis of Purpureocillium Lilacinum Isolates from Different Origins and Proposal of the New Species Purpureocillium Lavendulum.” *Mycologia* 105(1):151–61.
- Pereira, G. A., A. C. Boliani, E. Furlani Junior, and others. 2014. “Use of the Antibiotics Sodium Ampicillin and Chloramphenicol to Control Contamination in Micropropagation ofThap Maeo’banana.” *Revista Ceres* 61(3):299–305.
- Prasad, Pushplata, Deepti Varshney, and Alok Adholeya. 2015. “Whole Genome Annotation and Comparative Genomic Analyses of Bio-Control

- Fungus *Purpureocillium Lilacinum*.” *BMC Genomics* 16(1):1004.
- Ravindran, Keppanan, Sivaperumal Sivaramakrishnan, Mubasher Hussain, Chandra Kanta Dash, Bamisope Steve Bamisile, Muhammad Qasim, and Wang Liande. 2018. “Investigation and Molecular Docking Studies of Bassianolide from *Lecanicillium Lecanii* against *Plutella Xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae).” *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 206–207(March):65–72.
- Rohlfs, Marko, and Alice C. L. Churchill. 2011. “Fungal Secondary Metabolites as Modulators of Interactions with Insects and Other Arthropods.” *Fungal Genetics and Biology* 48(1):23–34.
- Schapovaloff, María E., Luis F. Angeli Alves, María I. Urrutia, and Claudia C. López Lastra. 2015. “Ocurrencia Natural de Hongos Entomopatógenos En Suelos Cultivados Con Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hil.) En Misiones, Argentina.” *Revista Argentina de Microbiología* 47(2):138–42.
- Schrank, Augusto, and Marilene Henning Vainstein. 2010. “*Metarhizium Anisopliae* Enzymes and Toxins.” *Toxicon*.
- Schumacher, V. L., B. Mangold, J. Lenzycki, L. Hinckley, D. A. Sutton, and S. Frasca. 2014. “Occurrence of Fruiting Structures Allows Determination of *Purpureocillium Lilacinum* as an Inciting Agent of Pleuritis and Pneumonia in a Loggerhead Sea Turtle (*Caretta Caretta*) by Histopathologic Correlation to Culture.” *Medical Mycology Case Reports* 6:42–45.
- Shen, Bingzheng, Zhijian Cao, Yingliang Wu, Wei Yi, Zhanyong Zhu, Zhihua Lv, Chengliang Zhu, and Yan Yu. 2020. “PurIisin, a Toxin-like Defensin Derived from Clinical Pathogenic Fungus *Purpureocillium Lilacinum* with Both Antimicrobial and Potassium Channel Inhibitory Activities.” *FASEB Journal* (August):1–15.
- Shin, Tae Young, Sung Min Bae, Dong Jun Kim, Hwi Geon Yun, and Soo Dong Woo. 2017. “Evaluation of Virulence, Tolerance to Environmental Factors and Antimicrobial Activities of Entomopathogenic Fungi against Two-Spotted Spider Mite, *Tetranychus Urticae*.” *Mycoscience* 58(3):204–12.
- Sievers, Fabian, and Desmond G. Higgins. 2014. “Clustal Omega.” *Current Protocols in Bioinformatics* 48(1):3.13.1-3.13.16.
- Silva, Gilson Soares da. 2011. “Métodos Alternativos Para o Controle de Fitonematoides.” *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 19:81–152.

- Singh, Sayandra, Rajesh Kumar Pandey, and B. K. Goswami. 2013. "Bio-Control Activity of *Purpureocillium Lilacinum* Strains in Managing Root-Knot Disease of Tomato Caused by *Meloidogyne Incognita*." *Biocontrol Science and Technology* 23(12):1469–89.
- Sung, Gi-Ho, Nigel L. Hywel-Jones, Jae-Mo Sung, J. Jennifer Luangsa-ard, Bhushan Shrestha, and Joseph W. Spatafora. 2007. "Phylogenetic Classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous Fungi." *Studies in Mycology* 57:5–59.
- Thi, Cham, Mai Le, Nhi Thi, Thuy Le, Duong Thi, and Thuy Nguyen. 2016. "The Genus *Purpureocillium* from Different Ecology in the Southeast Vietnam." *International Journal of Agricultural Technology* 12(7):2255–74.
- Thomas, Matthew B., and Andrew F. Read. 2007. "Fungal Bioinsecticide with a Sting." *Nature Biotechnology*.
- Togawa, Roberto C., Marcelo M. Brigido, Candice M. R. Santos, and Manoel T. S. Júnior. 2006. "The Use of The." (C):70770.
- Togawa, Roberto C., and Marcelo Macedo Brigido. 2003. "PHPH : Web Based Tool for Simple Electropherogram Quality Analysis." *1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi 1*.
- Toledo-Hernández, Ricardo A., Jorge Toledo, Javier Valle-Mora, Francisco Holguín-Meléndez, Pablo Liedo, and Graciela Huerta-Palacios. 2019. "Pathogenicity and Virulence of *Purpureocillium Lilacinum* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) on Mexican Fruit Fly Adults." *Florida Entomologist* 102(2):309–14.
- Veidenberg, Andres, and Ari Löytynoja. 2021. "Evolutionary Sequence Analysis and Visualization with Wasabi." Pp. 225–40 in *Multiple Sequence Alignment: Methods and Protocols*, edited by K. Katoh. New York, NY: Springer US.
- Wakil, Waqas, M. Usman Ghazanfar, Tahira Riasat, Young Jung Kwon, Mirza Abdul Qayyum, and Muhammad Yasin. 2013. "Occurrence and Diversity of Entomopathogenic Fungi in Cultivated and Uncultivated Soils in Pakistan." *Entomological Research*.
- Wang, Chengshu, and Raymond J. St. Leger. 2007. "The MAD1 Adhesin of *Metarhizium Anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to

- Plants.” *Eukaryotic Cell*.
- Wang, Gang, Zhiguo Liu, Runmao Lin, Erfeng Li, Zhenchuan Mao, Jian Ling, Yuhong Yang, Wen Bing Yin, and Bingyan Xie. 2016. “Biosynthesis of Antibiotic Leucinostatins in Bio-Control Fungus *Purpureocillium Lilacinum* and Their Inhibition on *Phytophthora* Revealed by Genome Mining.” *PLoS Pathogens* 12(7):1–30.
- Wang, Rulin, Chunxian Jiang, Xiang Guo, Dongdong Chen, Chao You, Yue Zhang, Mingtian Wang, and Qing Li. 2020. “Potential Distribution of *Spodoptera Frugiperda* (J.E. Smith) in China and the Major Factors Influencing Distribution.” *Global Ecology and Conservation* 21:e00865.
- Whalon, Mark E., David Mota-Sanchez, and Robert M. Hollingworth. 2008. *Global Pesticide Resistance in Arthropods*.
- Yoshida, Ruriko, and Masatoshi Nei. 2016. “Efficiencies of the NJp, Maximum Likelihood, and Bayesian Methods of Phylogenetic Construction for Compositional and Noncompositional Genes.” *Molecular Biology and Evolution* 33(6):1618–24.
- Zheng, Peng, Yongliang Xia, Siwei Zhang, and Chengshu Wang. 2013. “Genetics of *Cordyceps* and Related Fungi.” *Applied Microbiology and Biotechnology*.

## ANEXO 1

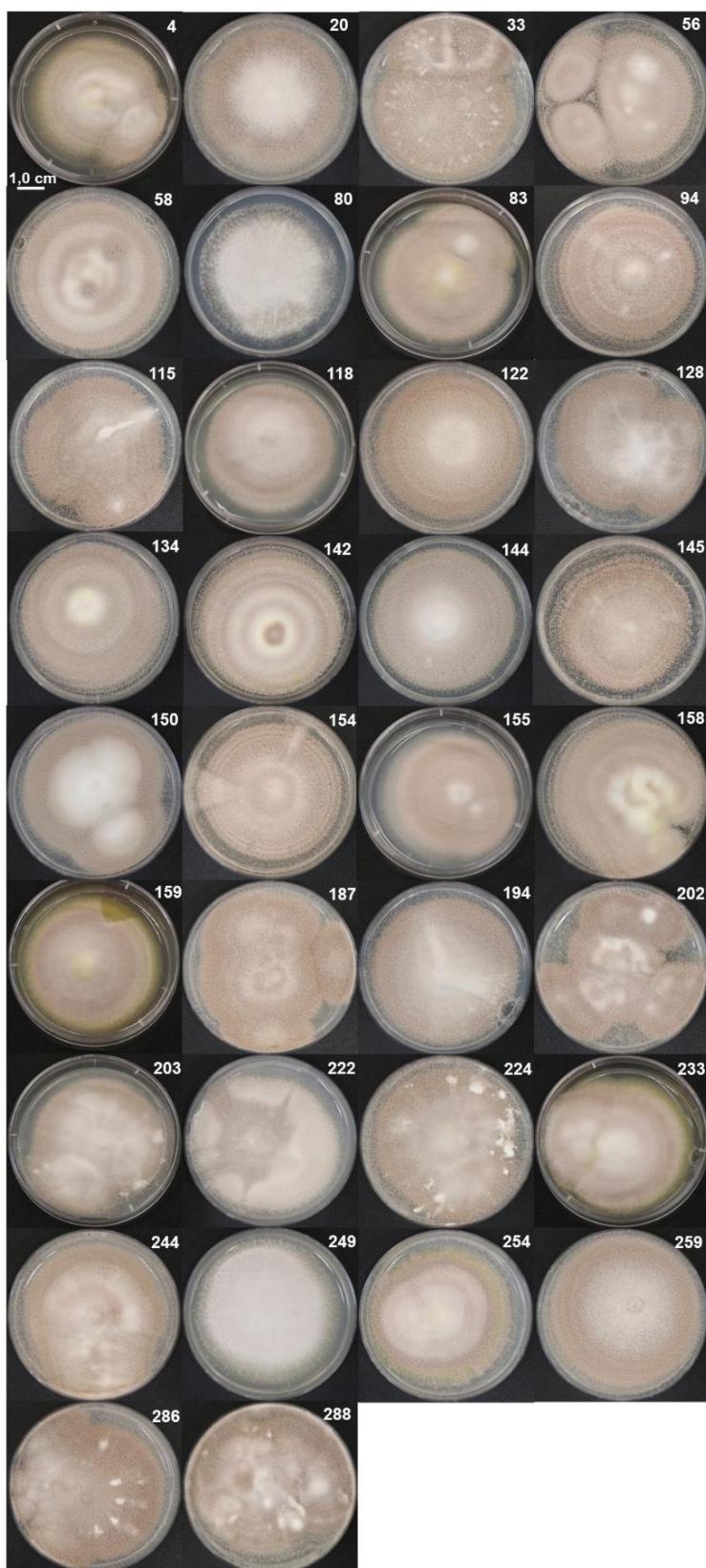
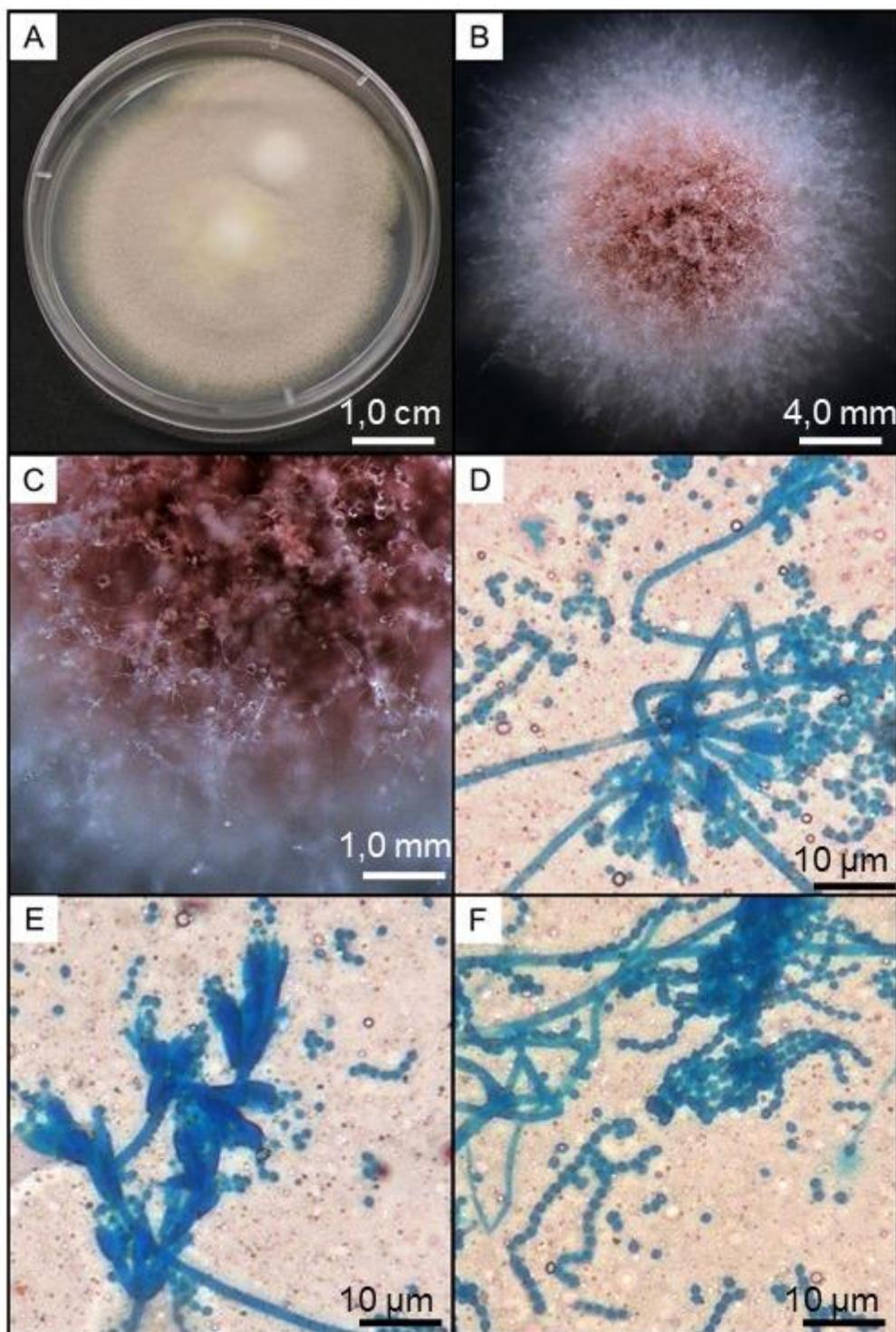


Figura 1.1. Morfologias de colônia dos isolados de *Purpureocillium* spp. estudados neste trabalho. Os isolados (AS) estão ordenados em ordem crescente, da esquerda à direita de cima à baixo.

## ANEXO 2



**Figura 2.1. Morfologia macro e microscópica do isolado AS83.** (A) visão da porção superior de uma colônia pontual de 6 dias de *Purpureocillium* spp.. Visualização em lupa (B) de uma colônia de 2 dias e (C) aproximação destacando a variação de coloração em decorrência da esporulação. Observações de microscopia, sob aumento de 40 vezes, de (D) corpos de frutificação jovens, (E) corpos de frutificação maduros e (F) esporos.