UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LUCIANA PEREIRA DIAS

Luz visível e limitação de oxigênio durante o crescimento micelial de fungos entomopatogênicos alteram expressão gênica e tolerância de conídios a condições de estresse

Lorena – SP
2018

LUCIANA PEREIRA DIAS

Luz visível e limitação de oxigênio durante o crescimento micelial de fungos entomopatogênicos alteram expressão gênica e tolerância de conídios a condições de estresse

Tese de Doutorado apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel

Versão Corrigida

Lorena - SP
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Dias, Luciana Pereira

Luz visível e limitação de oxigênio durante o crescimento micelial de fungos entomopatogênicos alteram expressão gênica e tolerância de conídios a condições de estresse. / Luciana Pereira Dias; orientador Drauzio Eduardo Naretto Rangel - Versão Corrigida. - Lorena, 2018.

82 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Fisiologia de fungos. 2. Luz visível. 3. Oxigênio. 4. Tolerância de conídios ao estresse. I. Título. II. Rangel, Drauzio Eduardo Naretto, orient.

*Dedico esse trabalho à minha amada avó Theresinha de Jesus Dias (in memoriam) e ao
meu querido sogro Paulo Ricardo Bento (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Á Deus, que me sustenta nos momentos difíceis e que é a base sólida da minha jornada.

Á Minha Avó Theresinha, que foi e sempre será meu grande exemplo de humildade, sabedoria, obediência e compaixão.

Aos meus pais Benedito Arlindo e Maria Luiza, que me não só me deram a vida, mas deram a vida por mim. São grandes exemplos de dignidade, caráter e honestidade.

Aos meus irmãos, Lucimara, Wagner e Vanderson, que desde cedo eu aprendi como é bom ter uma família grande e como não ficamos sós quando temos pessoas que amamos por perto.

Aos meus sobrinhos Evelyn, Erika, Erik, Amadan, Naoto, Stephanie, Emily e Beatriz, que são meus amados filhos adotivos.

Aos familiares e amigos, que deram todo apoio nos momentos difíceis.

Ao meu marido Athos, que tolera a minha chatice, que sempre me apoiou nos momentos difíceis e me incentiva a sempre seguir em frente.

Á aquela que me concedeu o meu maior título “Mãe”, que me trouxe luz e que me ensinou o verdadeiro valor da vida. Meu maior amor, Liz.

Aos meus sogros Paulo Ricardo, Márcia e cunhado Davi, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Á família Bentos e Fagundes, por todo carinho com a minha família.

Á Maiara por todo o carinho e ao lindo Martín, que me ensinou que a vida se resume em amor e que precisamos viver isso intensamente.

Á Escola Estadual Prof. Xenofonte Strabão de Castro, que foi o meu berço de ensino.

Á Universiade do Vale do Paraíba, que foi a minha base no processo acadêmico.

Á Universidade Federal de Lavras, que me ensinou muito no curso de Microbiologia.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), que possui ótimos professores e se preocupam com o bem-estar do aluno.

Ao secretário do programa de Pós-Graduação André, por sempre me auxiliar com carinho e respeito.

Ao professor Drauzio E. N Rangel.

Á FAPESP por me conceder a bolsa de doutorado de 2013 a 2015 (processo 2013/25964-2).

RESUMO

DIAS, L.P. **Luz visível e limitação de oxigênio durante o crescimento micelial de fungos entomopatogênicos alteram expressão gênica e tolerância de conídios a condições de estresse.** 2018. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

O efeito da exposição à luz visível e a limitação de oxigênio durante o crescimento micelial foi investigado na tolerância de conídios de dez fungos entomopatogênicos a: (A) radiação UV; (B) estresse osmótico causado pelo cloreto de potássio (KCl) e (C) estresse genotóxico provocado por 4-nitroquinoline-1-óxido (4-NQO). No primeiro experimento, foi avaliado o limiar de fotoativação de *Metarhizium robertsii*. Foram estudadas quatro intensidades de luz com 1, 3, 4 e 5 lumens, nas quais, foi avaliada a germinação e o aumento de tolerância ao estresse osmótico. No segundo experimento, foi analisada a influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV, KCl, e 4-NQO em dez espécies de fungos entomopatogênicos. No terceiro experimento, foi avaliado a influência da luz branca, azul, verde e vermelha no aumento de tolerância à radiação UV e estresse osmótico em *M. robertsii*. No quarto experimento, foi avaliada a influência da limitação de oxigênio no aumento de tolerância à radiação UV, KCl, e 4-NQO em dez espécies de fungos entomopatogênicos. No quinto experimento, foi utilizado o isolado *M. robertsii* (ARSEF 2575), foi analisado a expressão dos genes provavelmente envolvidos na indução da tolerância ao estresse quando conídios são produzidos sob luz visível e limitação de oxigênio. No primeiro experimento, conídios produzidos sob a luz branca apresentaram maior tolerância ao estresse osmótico em comparação com os conídios produzidos no escuro. Não houve grande diferença de tolerância entre as intensidades de luz testadas. No segundo experimento, a luz branca induziu o aumento de tolerância aos estresses em *B. bassiana* (KCl e 4NQO), *M. brunneum* (KCl e 4NQO), *M. robertsii* (UV e KCl), *T. cylindrosporum* (KCl), *I. fumosorosea* (UV), *L. aphanocladii* (KCl) e *A. aleyrodinis* (KCl e 4NQO). No terceiro experimento, conídios produzidos sob a luz branca e azul, foram mais tolerantes à radiação UV e ao estresse osmótico, conídios crescidos sob a luz vermelha foram menos tolerantes. No quarto experimento, a hipoxia induziu o aumento de tolerância aos estresses em *B. bassiana* (UV, KCl e 4NQO), *M. brunneum* (UV, KCl e 4NQO), *M. robertsii* (UV, KCl), *M. anisopliae* (UV e KCl), *T. inflatum* (KCl) e *A. aleyrodinis* (KCl e 4NQO). A anoxia induziu o aumento de tolerância ao estresse em seis isolados, *B. bassiana* (UV e 4NQO), *M. brunneum* (KCl), *M. anisopliae* (KCl e 4NQO), *M. robertsii* (UV e KCl), *T. inflatum* (KCl), *A. aleyrodinis* (4NQO). O estresse nutritivo (MM) induziu o aumento de tolerância aos estresses em *B. bassiana* (UV, KCl e 4NQO), *M. brunneum* (UV e KCl), *M. robertsii* (UV e KCl) e *M. anisopliae* (UV e KCl), *T. cylindrosporum* (UV), *I. fumosorosea* (KCl), *T. inflatum* (UV) e *S. lanosoniveum* (KCl). No quinto experimento, os genes superexpressos foram: Mrhsp30 (MM, luz branca, luz azul, vermelha, luz verde, anoxia), Mrhsp101 (luz vermelha, a luz verde e hipoxia), Mr6-4 phr (MM, luz branca, luz azul), Mrsod2 (MM, luz vermelha), Mrtps (luz azul, vermelha, verde e hipoxia), Mrpr1 (luz verde). Neste estudo, a luz branca e limitação de oxigênio foram determinantes no aumento de tolerância aos estresses.

Palavras-chave: Fisiologia de fungos, Luz visível, Oxigênio, Tolerância de conídios ao estresse.

ABSTRACT

DIAS, L.P. **Visible light and oxygen limitation during mycelial growth of entomopathogenic fungi alter gene expression and conidia tolerance to stress conditions**. 2018. 82 p. Thesis (Doctoral of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

The effect of exposure of visible light and oxygen limitation during mycelial growth was investigated in the tolerance of conidia of ten entomopathogenic fungi to: (A) UV radiation; (B) osmotic stress caused by potassium chloride (KCl) and (C) genotoxic stress caused by 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO). In the first experiment, the photoactivation threshold of *Metarhizium robertsii* was evaluated. Four light intensities with 1, 3, 4 and 5 lumens were studied, where germination and increased tolerance to osmotic stress were evaluated. In the second experiment, the influence of white light without increasing the tolerance to UV, KCl, and 4-NQO in ten species of entomopathogenic fungi was analyzed. In the third experiment, the influence of white, blue, green and red light on the increase of tolerance to UV radiation and osmotic stress in *M. robertsii* was evaluated. In the fourth experiment, the influence of oxygen limitation on the increase of tolerance to UV, KCl, and 4-NQO in ten entomopathogenic fungi species were evaluated. In the fifth experiment, the *M. robertsii* isolate (ARSEF 2575) was used; an expression of the genes involved in the induction of stress tolerance was analyzed when conidia are produced under visible light and oxygen limitation. In the first experiment, conidia produced under white light presented greater tolerance to osmotic aesthetics in comparative eaters. There were no major differences in tolerance between tested light intensities. In the second experiment, white light induced increased stress tolerance in *B. bassiana* (KCl e 4NQO), *M. brunneum* (KCl e 4NQO), *M. robertsii* (UV e KCl), *T. cylindrosporum* (KCl), *I. fumosorosea* (UV), *L. aphanocladii* (KCl) e *A. aleyrodis* (KCl e 4NQO). In the third experiment, conidia produced under white and blue light were more tolerant to UV radiation and osmotic stress, conidia grown under the red light so tolerant. In the fourth experiment, hypoxia induced increased stress tolerance in *B. bassiana* (for UV, KCl e 4NQO), *M. brunneum* (UV, KCl e 4NQO), *M. robertsii* (UV, KCl), *M. anisopliae* (UV e KCl), *T. inflatum* (KCl) e *A. aleyrodis* (KCl e 4NQO). Anoxia induced higher tolerance in *B. bassiana* (for UV e 4NQO), *M. brunneum* (KCl), *M. anisopliae* (KCl e 4NQO), *M. robertsii* (UV e KCl), *T. inflatum* (KCl), *A. aleyrodis* (4NQO). The nutritive stress (MM) induced increased stress tolerance in *B. bassiana* (UV, KCl e 4NQO), *M. brunneum* (UV e KCl), *M. robertsii* (UV e KCl) e *M. anisopliae* (UV e KCl), *T. cylindrosporum* (UV), *I. fumosorosea* (KCl), *T. inflatum* (UV) e *S. lanosoniveum* (KCl). In the fifth experiment, the over-expressed genes were Mrhsp30 (MM, white light, blue light, red, green light, anoxia), Mrhsp101 (red light, green light and hypoxia), Mr6-4 phr (MM, white light, blue light), Mrsod2 (MM, red light), Mrtps (blue, red, green and hypoxia light), Mrpr1 (green light). In this study, white light and oxygen limitation were determinants of increased stress tolerance.

Keywords: Fungi physiology, Visible light, Oxygen, Conidia tolerance to stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aderência do esporo do fungo na cutícula do hospedeiro.....	18
Figura 2 – Fluxograma das etapas experimentais: (a) Primeira etapa; (b) Segunda etapa; (c) Terceira etapa; (d) Quarta etapa. (e) Quinta etapa.....	27
Figura 3 – Leituras do espectroradiômetro do par de lâmpadas fluorescentes (Philips, 15W branco fresco) da incubadora Marconi.....	31
Figura 4 – Leituras do espectroradiômetro do par de lâmpadas fluorescentes (Philips, 15W branco fresco).	34
Figura 5 – Irradiância espectral do equipamento QSUN® Xenon Test Chamber XE3.....	36
Figura 6 – Leituras do espectroradiômetro do par de lâmpadas fluorescentes (Philips, 15W branco fresco).....	38
Figura 7 – Irradiância espectral dos comprimentos de luz azul, verde e vermelha.....	39
Figura 8 – Média da porcentagem de germinação de <i>Metarhizium robertsii</i> (ARSEF 2575).....	47
Figura 9 – Média da porcentagem de germinação de <i>Metarhizium robertsii</i> (ARSEF 2575).....	49
Figura 10 – Média da porcentagem de germinação de conídios tratados com radiação UV de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio BDA no escuro (Escuro); 2) meio BDA sob luz branca (Luz); 3) condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM).....	52
Figura 11 – Média da porcentagem de germinação de conídios tratados com KCl de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio BDA no escuro (Escuro); 2) meio BDA sob luz branca constante (Luz) ; 3) condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM).....	54
Figura 12 – Média da porcentagem de germinação de conídios tratados com 4NQO de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio BDA no escuro (Escuro); 2) meio BDA sob luz branca constante (Luz); 3) condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM).....	56
Figura 13 – Média da porcentagem de germinação de conídios expostos a radiação UV em <i>Metarhizium robertsii</i> (ARSEF 2575), produzido em: 1) meio (BDA) crescido no escuro (controle); 2) em meio BDA crescido sob (A) luz branca (irradiância 4.98 W m ⁻²); (B) luz azul (irradiância 4.8 W m ⁻²); (C) luz azul (irradiância 9.7 W m ⁻²); (C) luz verde (irradiância	

2.2 W m⁻²); (D) luz vermelha (irradiância 2.8 W m⁻²) and 3) sob nutricional estresse (MM) no escuro.....58

Figura 14 – Média da porcentagem de germinação de conídios de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio de cultura de batata dextrose agar (BDA) em condições normóxicas por 14 dias (Controle); 2) meio BDA em condições de hipoxia (placas seladas com Parafilm) por 14 dias (Selada); 3) em condições de anaerobiose a partir do segundo dia de crescimento por cinco dias, e transferidas em condições normóxicas por sete dias (Anaerobiose); e 4) em condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM).....60

Figura 15 – Média da porcentagem de germinação de conídios de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio de cultura de batata dextrose agar (BDA) em condições normóxicas por 14 dias (Controle); 2) meio BDA em condições de hipoxia (placas seladas com Parafilm) por 14 dias (Selada); 3) em condições de anaerobiose a partir do segundo dia de crescimento por cinco dias, e transferidas em condições normóxicas por sete dias (Anaerobiose); e 4) em condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM).....63

Figura 16 – Média da porcentagem de germinação de conídios de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio de cultura de batata dextrose agar (BDA) em condições normóxicas por 14 dias (Controle); 2) meio BDA em condições de hipoxia (placas seladas com Parafilm) por 14 dias (Selada); 3) em condições de anaerobiose a partir do segundo dia de crescimento por cinco dias, e transferidas em condições normóxicas por sete dias (Anaerobiose); e 4) em condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM)66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens de fungos entomopatogênicos.....	28
Tabela 2 – Primers utilizados.....	42
Tabela 3 – Valores de E e R ² da regressão linear por diluições dos genes alvos e de referência de <i>M. robertsii</i> (ARSEF 2575).....	42
Tabela 4 – Correlação entre as tolerâncias de conídios em diferentes estresses.....	69
Tabela 5 – Expressão média de genes superexpressos em <i>M. robertsii</i> (ARSEF 2575) cultivados em: meio mínimo, luz branca, luz azul, luz verde, luz vermelha, luz verde, hipóxia e anoxia, comparando-se com o controle cultivado em meio BDA no escuro.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-NQO	1-óxido de 4-nitroquinolina
BDA	Batata dextrose agar
BDAY	Batata dextrose agar suplementado com extrato de levedura
MM	Meio mínimo
KCl	Cloreto de potássio
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Controle biológico.....	16
2.2 Fungos entomopatogênicos	17
2.3 Adaptação à luz visível em fungos.....	18
2.4 Adaptação a diferentes condições de oxigênio	19
2.5 Tolerância de fungos a diferentes estresses do meio ambiente.....	20
2.5.1 Radiação UV	21
2.5.2 Estresse causado pelo genotóxico 4- nitroquinolina 1- óxido (4NQO)	22
2.5.3 Estresse osmótico.....	23
2.5.4 Estresse nutritivo.....	23
3 OBJETIVOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Etapas do estudo	26
4.2 Isolados	28
4.3 Meios de cultura e condições de cultivo	29
4.4 Requerimentos energéticos e limiar para fotoativação utilizando diferentes intensidades de luz branca em <i>Metarhizium robertsii</i>	29
4.4.1 Germinação de conídios em diferentes intensidades de luz branca em <i>Metarhizium robertsii</i>	32
4.4.2 Tolerância de conídios produzidos em diferentes intensidades de luz branca ao estresse osmótico em <i>Metarhizium robertsii</i>	32
4.5 Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido.....	33
4.5.1 Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV	34
4.5.2 Influência da luz branca no aumento da tolerância ao estresse osmótico.....	36
4.5.3 Influência da luz branca no aumento da tolerância ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido	36
4.6 Influência da luz azul, vermelha e verde no aumento da tolerância à radiação UV e ao estresse osmótico em <i>Metarhizium robertsii</i>	37
4.7 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido	39
4.7.1 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV	40
4.7.2 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância ao estresse osmótico	40
4.7.3 Influência de Hipoxia e Anoxia tolerância ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido	40
4.8 Avaliação da germinação em todas as etapas experimentais.....	40
4.9 Análises de expressão gênica.....	41

4.10	Análise estatística	43
4.10.1	Requerimentos energéticos e limite para fotoativação utilizando diferentes intensidades de luz branca em <i>Metarhizium robertsii</i>	43
4.10.2	Germinação de conídios em diferentes intensidades de luz branca em <i>Metarhizium robertsii</i>	43
4.10.3	Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido.....	44
4.10.4	Influência da luz azul, vermelha e verde no aumento da tolerância à radiação UV e ao estresse osmótico em <i>Metarhizium robertsii</i>	44
4.10.5	Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Requerimentos energéticos e limite para fotoativação utilizando diferentes intensidades de luz branca em <i>Metarhizium robertsii</i>	46
5.1.1	Germinação de conídios em diferentes intensidades de luz branca em <i>Metarhizium robertsii</i>	46
5.1.2	Tolerância de conídios produzidos em diferentes intensidades de luz branca ao estresse osmótico em <i>Metarhizium robertsii</i>	47
5.2	Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido	50
5.2.1	Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV.....	50
5.2.2	Influência da luz branca no aumento da tolerância ao estresse osmótico	53
5.2.3	Influência da luz branca no aumento da tolerância ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido.....	55
5.3	Influência da luz azul, vermelha e verde no aumento da tolerância à radiação UV e ao estresse osmótico	57
5.4	Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido.....	59
5.4.1	Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV.....	59
5.4.2	Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância ao estresse osmótico	62
5.4.3	Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido.....	65
5.5	Correlação entre a tolerância de conídios produzidos sob luz visível, anoxia e hipoxia aos diferentes estresses	68
5.6	Análises de expressão gênica	70
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle biológico utilizado como alternativa aos inseticidas químicos em vários países (ALSTON et al., 2005; LI et al., 2010). Quando usado como micoinseticidas, estes fungos estão sujeitos a vários tipos de condições de estresse ambiental (RANGEL et al., 2015a), como calor solar (RANGEL et al., 2010; SOUZA et al., 2014), radiação ultravioleta (BRAGA et al., 2015; RANGEL et al., 2015a), nutrientes (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008), agentes oxidantes (AZEVEDO et al., 2014) e estresses osmóticos (STEVENSON et al., 2015).

A luz solar é um fator ambiental chave que determina o comportamento de organismos vivos. Entre as diversas respostas reguladas pela luz nos fungos, as observadas comumente estão associadas a processos fundamentais, como crescimento, desenvolvimento, reprodução, metabolismo e ritmos circadianos (CORROCHANO, 2007; HERRERA-ESTRELLA; HORWITZ, 2007). Além disso, o estudo realizado com o fungo entomopatogênico *M. robertsii* demonstrou que a luz branca durante o crescimento micelial induz a produção de conídios com alta tolerância à radiação UV-B (RANGEL et al., 2011), evidenciando a importância de se investigar a influência da luz visível no aumento de tolerância a estresses em fungos entomopatogênicos.

Além a influência da luz, outro fator que pode afetar o metabolismo de fungos é a limitação de oxigênio. O oxigênio é importante para grande parte dos organismos eucariontes e a falta de oxigênio pode ocorrer com uma frequência bastante elevada, dependendo do modo de vida do organismo (CAMILO; GOMES, 2010). No caso dos fungos entomopatogênicos, as atmosferas ricas em oxigênio estimulam a produção de conídios em *M. anisopliae* var. *lepidiotum* (TLECUITL-BERISTAIN et al., 2010) e melhoram a termotolerância em *Isaria fumosorosea* (MIRANDA-HERNÁNDEZ et al., 2014). Novamente, dados da literatura evidenciam a importância de estudar a influência de diferentes concentrações de oxigênio no aumento de tolerância aos estresses.

Neste contexto, o presente estudo, teve como objetivo verificar os efeitos da luz visível bem como diferentes concentrações de oxigênio no aumento de tolerância à radiação UV, ao estresse osmótico causado pelo KCl e ao agente genotóxico 4NQO em dez isolados de fungos entomopatogênicos. Além disso, foi analisado a expressão de genes que estão provavelmente envolvidos na indução da tolerância ao estresse quando conídios de fungos entomopatogênicos são produzidos sob o escuro, luz, meio mínimo (MM), hipóxia e anóxia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle biológico

Controle biológico pode ser definido como qualquer atividade envolvendo inimigos naturais vivos que visam reduzir ou suprimir uma população que represente uma praga. É um método dentro do manejo integrado de pragas (MIP) que determina a seleção das táticas no controle de pragas, baseadas nas análises custo/benefício e impacto sobre produtores e meio ambiente (EILENBERG; HAJEK; LOMER, 2001).

O uso indiscriminado de agrotóxicos tem sido durante muitos anos o principal meio de controle de pragas em diversas culturas agrícolas no Brasil e em diversas partes do mundo (LI et al., 2010; PIGNATI et al., 2017). Com isso, são causados vários desequilíbrios ambientais nesses ecossistemas, que vão desde a superpopulação de pragas, seleção de insetos resistentes, poluição dos solos e aquíferos até danos à saúde humana (PEDIGO, 2002).

Os fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle biológico que podem ser usados como uma alternativa aos inseticidas químicos utilizados na agricultura para o controle de pragas e doenças devido à segurança para os seres humanos e outros organismos não-alvo e a redução de resíduos de inseticidas nos alimentos (BARROS et al., 2010).

No Brasil, os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem relatados. A partir de 1964, a ocorrência natural de *M. anisopliae*, começou a despertar a atenção dos pesquisadores. Em 1969 passou a ser estudada por diversos centros de pesquisa devido à doença das cigarrinhas da cana-de-açúcar (ALVES, 1992; LI et al., 2010).

Tem havido um interesse renovado em fungos como agentes de controle biológico no Brasil. Várias novas empresas privadas, cooperativas, agricultores plantadores, bem como usinas de açúcar e álcool começaram a produzir *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Sporothrix insectorum* (ALVES et al., 2008; PARRA, 2014). Considerando as dificuldades na obtenção de informações sobre a produção de fungos entomopatogênicos de todos os engenhos de cana e empresas públicas e privadas, presume-se que a área pulverizada com fungos entomopatogênicos é em torno de um milhão de hectares. Isto é consistente com os dados mais recentes, revelando que 1.882 toneladas de *Metarhizium*, 95 toneladas de *Beauveria*, e 12,5 toneladas de *Sporothrix insectorum* foram produzidas por ano em apenas 10 usinas ou

empresas privadas nos estados de Alagoas e São Paulo (LI et al., 2010).

2.2 Fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos são importantes para a agricultura e podem ser encontrados em regiões distintas da Terra. Devido à sua diversidade genética podem parasitar diferentes hospedeiros (ROBERTS, 1989). A maioria dos representantes ocorre no filo *Entomophthoromycota* e *Ascomycota* (HUMBER, 2012; SUNG et al., 2007).

Pelo menos 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos são entomopatogênicos. Os organismos mais estudados pertencem aos gêneros *Aschersonia*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, e *Verticillium* (HUMBER, 2011). Os mais estudados e usados em programas de controle biológico são *Metarhizium* e *Beauveria* (LI et al., 2010).

O fungo *M. anisopliae* tem sido utilizado em larga escala como um agente de controle biológico de grande eficácia, tendo como hospedeiro mais de 200 espécies de insetos, sendo muito usado como bioinseticidas de cigarrinhas de cana - de açúcar (LI et al., 2010). Assim como o fungo *B. bassiana* é uma espécie muito utilizada como micoinseticida em diversos tipos de plantações para o biocontrole de pragas como a broca-do-café no Brasil e Colômbia (FARIA; WRAIGHT, 2007).

Os fungos são particularmente bem adequados para o desenvolvimento como bioinseticidas porque ao contrário das bactérias e vírus que têm de ser ingerido para causar doenças, fungos infetam insetos por penetração direta da cutícula e, em seguida, a colonização da hemocele do inseto (ALVES, 1998; WANG, 2005).

Alguns fungos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como os ovos, larvas, pupas e adultos (COOK et al., 1996). O processo de infecção dos fungos entomopatogênicos ocorre através da adesão e germinação de conídios na superfície do inseto, seguida de penetração física por um apressório através da cutícula (SOSA-GOMEZ, 2000). Além da penetração física, ocorre a ação de enzimas extracelulares tais como proteases, lipases e quitinases que permitem a penetração das hifas por hidrolisar o exoesqueleto do inseto (FREIMOSER, 2005; LEGER et al., 1996). As hifas desenvolvem-se na cavidade interna no corpo do hospedeiro, ocorrendo em seguida à liberação de micotoxinas que são metabólitos secundários. As micotoxinas atuam contra o sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo assim o estabelecimento do patógeno (HOHL; FELDMESSER, 2007). O micélio surge externamente do corpo do inseto produzindo

esporos que poderão ser dispersos no ambiente infectando assim outros insetos (SOSA-GOMEZ, 2000) (Figura 1).

Os fungos filamentosos são capazes de habitar diversos nichos ecológicos e os esporos podem percorrer longas distâncias através do ar o que o permite repousar em ambientes diferentes de sua origem até que o fungo possa crescer, portanto ele deve ser capaz de se adaptar rapidamente a qualquer ambiente, ajustando continuamente sua fisiologia, a fim de aumentar a sobrevivência (BATEMAN et al., 1993).

Figura 1 – Aderência do esporo do fungo na cutícula do hospedeiro

Fonte: Singh, Raina e Singh (2017).

2.3 Adaptação à luz visível em fungos

As espécies de fungos exibem a capacidade de resposta à luz em todo o espectro visível, desde ultravioleta ao vermelho distante. A gama de comprimento de onda perceptível abrange mais de dez ordens de magnitude, desde a luz de estrelas a pleno sol (PURSCHWITZ et al., 2006). Esta capacidade tem base genética mediada por proteínas fotossensíveis que são altamente conservadas em todo o reino dos fungos (LOSI, 2007). Assim, uma variedade de fotorreceptores é conservada em fungos (PURSCHWITZ et al., 2006).

Fotorreceptores são moléculas que recebem fótons através de cromóforos que absorvem a luz e transduzem energia dos fótons para dentro da célula (PURSCHWITZ et

al., 2006). Em fungos são encontrados fotorreceptores, tais como, opsinas, fitocromos, criptocromos e o complexo White Collar (WC) (SÁNCHEZ-MURILLO et al., 2004). Na absorção luminosa, estas proteínas fotorreceptoras são auxiliadas por co-fatores, conhecidos como cromóforos (HERRERA-ESTRELLA; HORWITZ, 2007). Fungos utilizam fotorreceptores com sensibilidades que cobrem todo o espectro de luz visível. Sensor de tensão de oxigênio e luz (LOV) e criptocromos são predominantemente sensíveis à luz azul, sensor rodopsina é sensível à luz azul e verde, e fitocromos absorvem a luz na maior parte vermelha (HEINTZEN, 2012).

A luz visível durante o crescimento micelial influencia: (1) o metabolismo primário (DUNLAP; LOROS, 2006) e metabolismo secundário (BAYRAM et al., 2008; FISCHER, 2008); (2) indução de proteínas de choque térmico Hsp 100 em *Phycomyces* (RODRIGUEZ-ROMERO; CORROCHANO, 2006) que são importantes na proteção das células contra várias condições de estresse por reparar as proteínas desnaturadas; (3) acumulação de trealose em esporos de *Neurospora crassa* (SHINOHARA et al., 2002) que estabiliza as proteínas no seu estado nativo e preserva a integridade das membranas; e (4) formação dos pigmentos melanina e carotenoides em diversas espécies de fungos (BUTLER; DAY, 1998).

A luz também promove a resistência à radiação UV em *Cryptococcus neoformans* (VERMA; IDNURM, 2013). A luz tem estimulado a produção de proteína de choque térmico (HSP100) em *Phycomyces* (RODRIGUEZ-ROMERO; CORROCHANO, 2006), além disso, a produção de carotenóides e outros metabólicos em *Neurospora crassa* (LUQUE et al., 2012).

A tolerância dos conídios de *M. robertsii* produzidos em meio batata dextrose agar suplementado com extrato de levedura (BDAY) sob luz branca contínua foi duas vezes maior do que os conídios produzidos em BDAY sob escuro contínuo (RANGEL et al., 2011, 2015b). No fungo zigomiceto *Phycomyces blakesleeanus*, o gene *hspA* que codifica uma proteína de choque térmico é induzido pela luz azul (RODRIGUEZ-ROMERO; CORROCHANO, 2006). Em *A. fumigatus*, a resposta à luz causou uma redução nas taxas de germinação de conídios, aumento da pigmentação das hifas e maior resistência a estresses oxidativos (FULLER et al., 2013).

2.4 Adaptação a diferentes condições de oxigênio

Além da influência da luz, outro fator que pode afetar o metabolismo de fungos é a limitação de oxigênio. A carência de oxigênio faz o metabolismo dos fungos sofrer

mudanças significativas (MASUO et al., 2010). Essas respostas podem levar a mudanças no estado fisiológico e metabólico de células, o que lhes permitem lidar com o estresse associado com restrição de oxigênio (CAMILO; GOMES, 2010). Além disso, sabe-se que os mecanismos de adaptação à hipoxia são variáveis e que esta condição é um fator na virulência dos fungos patogênicos (ERNST; TIELKER, 2009).

Os genes que respondem a alterações na disponibilidade de oxigênio podem ser colocados em duas grandes categorias: os genes “aeróbicos”, que são expressos de forma ideal sob condições de normoxia e genes “hipóxicos”, que são expressos de forma ótima sob baixo teor de oxigênio ou condições anóxicas (KWAIST; BURKE; POYTON, 1998). Os microrganismos podem se especializar como aeróbios obrigatórios ou anaeróbios facultativos, ou tolerar níveis de oxigênio intermediários. Em geral, a mudança de normoxia para hipoxia ou condições anóxicas requer uma modificação enorme no metabolismo energético (ERNST; TIELKER, 2009). Em condições anóxicas ocorre a redução da disponibilidade de ATP, essencial para funções celulares impedindo o crescimento celular. A exposição prolongada a anoxia provoca a morte celular (MASUO et al., 2010). A ausência de crescimento radial em condições anaeróbicas foi observada em *A. fumigatus*, onde o estado de anaerobiose causou a inibição da germinação (TAUBITZ et al., 2007).

Estudos recentes sobre o efeito da concentração de oxigênio no rendimento e qualidade dos conídios produzidos por fungos entomopatogênicos têm mostrado que a aplicação de impulsos de oxigênio (O₂ a 26%) melhora a produção de conídios em *Metarhizium anisopliae* (TLECUITL-BERISTAIN et al., 2010). Foi observada também em *A. fumigatus* sob condições de hipóxia a indução à defesa ao estresse oxidativo, representando uma característica de adaptação à hipóxia (GRAHL et al., 2012). Além disso, foi relatado que conídios de *M. robertsii* produzidos sob condições de hipoxia (placas seladas) em meio BDAY apresentaram um aumento de tolerância ao calor (RANGEL et al., 2015b).

2.5 Tolerância de fungos a diferentes estresses do meio ambiente

Fungos entomopatogênicos desempenham um papel crucial no controle de populações de insetos pragas agrícola. Estes fungos têm uma distribuição mundial e são encontrados em uma variedade de ambientes e biomas (MEYLING; EILENBERG, 2006, 2007; ZIMMERMANN, 2007). Sendo assim, os microrganismos que vivem em ambientes diversos e frequentemente severos devem ser adaptados para lidar com uma ampla variação de estresses ambientais.

Durante a infecção, os fungos entomopatogênicos devem suportar várias condições de estresses inevitáveis como a radiação solar ultravioleta (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000) e as mudanças de comportamento do inseto (HUNT; CHARNLEY, 2011). No entanto, apesar de um arsenal de adaptações para o meio ambiente, esses fatores de estresse são obstáculos importantes para o sucesso no controle de pragas (EKESI; MANIANIA; LUX, 2003; RANGEL et al., 2004). Portanto, estudos de estresse fúngico são essenciais para melhorar a tolerância ao estresse e resistência no meio de fungos patogênicos de insetos (DE MENEZES et al., 2015; RANGEL et al., 2015a).

2.5.1 Radiação UV

Várias mudanças ambientais estão ocorrendo nos ecossistemas terrestres, incluindo o aumento da radiação solar ultravioleta e aquecimento nas latitudes mais elevadas (CALDWELL et al., 2003). Alguns microrganismos são certamente expostos à intensa radiação UV-B incidente no campo, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, tanto saprófitos como patógenos (PAUL et al., 1997). Um dos principais agentes responsáveis pelo controle das populações naturais de fungos é a fração ultravioleta (UV) do espectro solar (PARNELL; BURT; WILSON, 1998; WILLOCQUET et al., 1996). As tentativas de superar essas limitações ambientais se concentraram na seleção de cepas mais tolerantes a radiação UV (BRAGA et al., 2001) e ao calor (RANGEL et al., 2005), alterando geneticamente a expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse (RANGEL et al., 2015b), ou manipulando a fisiologia do fungo para melhorar sua tolerância ao estresse (DE MENEZES et al., 2015; RANGEL et al., 2004; RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2008).

A radiação ultravioleta é geralmente dividida em três subcategorias conforme seu comprimento de onda, UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) e UV-C (100-280 nm). No entanto, apenas UV-B e UV-A atingem a superfície da Terra, porque o ozônio reduz drasticamente a penetração de radiação com comprimentos de onda menores que 320 nm (BRAGA et al., 2015; CALDWELL; FLINT, 1997). O UV-A é responsável por cerca de 95% da energia total do espectro UV que atinge a superfície da Terra e UV-B é responsável pelos restantes 5%. A radiação UV-B tem efeitos mais deletérios do que UV-A procarionóticos e eucarióticos (BRAGA et al., 2011; FLINT; CALDWELL, 2003).

O DNA é a molécula-alvo mais sensível à radiação UV-B na maioria dos sistemas que foram estudados (QUAITE; SUTHERLAND; SUTHERLAND, 1992). Ao nível molecular, a radiação UV pode danificar proteínas, DNA, RNA e muitos outros constituintes

celulares. A radiação UV-B é diretamente absorvida pelo DNA e causa danos diretos no DNA (e.g. dímeros de pirimidina). Entretanto a radiação UV-A (320–400 nm) ao nível celular a radiação UV-A causa estresse oxidativo e consequentemente causa danos indiretos pela fotossensibilização através da formação de radicais superóxidos, o que resulta em estresse oxidativo que pode danificar os componentes celulares como proteínas, lipídios e DNA (FRIEDBERG, E. C., WALKER, G. C., SIEDE, W. 1995).

A luz solar inclui um conjunto variável de condições e os mais importantes são a intensidade e o conteúdo espectral (BRAGA et al., 2015). Alguns estudos com fungos foram realizados usando luz solar natural (BRAGA et al., 2001b; FANG; ST. LEGER, 2012). No entanto, devido às circunstâncias incontroláveis associadas ao trabalho ao ar livre, a maioria dos estudos sobre o efeito da radiação solar em fungos é realizado em laboratório usando lâmpadas fluorescentes UV-B, que geralmente são instaladas dentro de incubadoras microbiológicas (BRAGA et al., 2001c; DE MENEZES et al., 2015; SANTOS et al., 2011; XIAO et al., 2012). No entanto, o espectro de emissão destas lâmpadas é muito diferente do espectro de radiação solar, por exemplo, a intensidade da radiação UV-A emitida por essas lâmpadas é muito menor do que a luz solar. Conseqüentemente, a tolerância fúngica à radiação UV determinada pelo uso de lâmpadas fluorescentes UV-B pode não se correlacionar bem com a tolerância à radiação solar (BRAGA et al., 2015).

2.5.2 Estresse causado pelo genotóxico 4- nitroquinolina 1- óxido (4NQO)

Embora o 1-óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) não seja conhecido no meio ambiente do inseto, de acordo com vários estudos, ele danifica o DNA de maneira similar à radiação UV (NAIR et al., 2000; VASILIEVA, 2002). O composto químico 4-NQO é um potente carcinógeno, e tem sido usado como mutagênico em bactérias e fungos para estudos genéticos sobre danos e reparo de DNA (DOWNES et al., 2014; THOMAS et al., 1991). Além disso, o 4-NQO causa mutagênese microbiana por quebra da cadeia de DNA e pela produção de adutos de transferência de carga (DOWNES ET AL., 2014). Além disso, o 4-NQO induz substituições em resíduos de guanina e adenina, embora com uma preferência muito maior pela guanina (DOWNES ET AL., 2014), produzindo danos de base, como dímeros de pirimidina ciclobutana e fotoprodutos (6-4). Essas lesões de DNA são geralmente reparadas por mecanismos diferentes, incluindo reparo de excisão de nucleotídeos (FRIEDBERG et al., 1995), fotorreativação (ESSEN, 2006) e reparo de endonuclease UV (YAJIMA et al., 1995). Além disso, o 4-NQO induz estresse oxidativo, evidenciado pela

produção de oxigênio reativo in vivo em cepas de bactérias com vários defeitos na defesa antioxidante (NUNOSHIBA; DEMPLE, 1993). Dado que o 4-NQO produz danos no DNA que é considerado semelhante ao causado pela radiação UV, procurou-se responder se a tolerância aos UV se correlacionaria com a resistência ao 4-NQO.

2.5.3 Estresse osmótico

Os principais fatores que influenciam a eficácia dos fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico incluem temperatura e estresse osmótico (LIU; PENG; XIA, 2012). No campo, os conídios podem perder a viabilidade em poucas horas por irradiação solar, e mesmo por uma quantidade limitada de água, leva ao estresse osmótico (MONTIEL-GONZÁLEZ et al., 2004). Além disso, na última etapa do processo infeccioso, os fungos precisam adaptar-se a altas pressões osmóticas na hemolinfa de insetos (WANG; DUAN; ST. LEGER, 2008).

A capacidade de sobreviver ao estresse osmótico requer várias adaptações envolvendo osmoregulação (HOHMANN, 2002), transporte de íons, homeostasia e síntese de melanina (KOGEE et al., 2006). Nessas condições, os fungos ajustam seus potenciais de soluto internos por acumulação de solutos, como glicerol, eritritol, manitol e trealose, o que reduz o potencial interno da água e limita as perdas osmóticas (RANGEL et al., 2015b). O glicerol e eritritol são considerados os maiores compostos osmoregulatórios em *Aspergillus nidulans*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus* implicando que o conteúdo foi elevado após o crescimento em meio osmoticamente alterado com cloreto de potássio (HALLSWORTH; MAGAN, 1994; HALLSWORTH; MAGAN, 1995).

Neste trabalho, o cloreto de potássio é utilizado porque o KCl é um estressor osmótico ambientalmente onipresente em diversos habitats de fungos (DE LIMA ALVES et al., 2015). Além disso, já foi utilizado em outro estudo com o fungo entomopatogênico *Metarhizium robertsii*, onde apresenta respostas semelhantes ao KCl e ao NaCl (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008).

2.5.4 Estresse nutritivo

A viabilidade, o desenvolvimento e crescimento vegetativo, a germinação dos conídios, a conidiogênese, o número de conídios produzidos, a virulência, a capacidade de ter tolerância a condições adversas de umidade, luz (raios ultravioleta), temperatura, são

alguns dos aspectos que já foram demonstrados serem influenciados pelo meio de cultura e condições de cultivo na produção do fungo (RANGEL et al., 2012; RANGEL 2015a).

Quando o fungo *Metarhizium anisopliae* foi crescido em meio de estresse osmótico, apresentou conídios com maior virulência, entretanto, este meio limitou o crescimento do fungo e a conidiação é drasticamente reduzida. O rendimento máximo de conídios foi alcançado no meio com relação C:N de 35:1, relação semelhante à do meio SDA e MM (SHAH; WANG; BUTT, 2005).

Vários estudos têm sido realizados para aumentar geneticamente ou fisiologicamente a tolerância de fungos entomopatogênicos a diversos estresses. Um dos meios mais fáceis (fisiológico) é crescer o fungo em meio de cultura pobre em fonte de carboidrato ou em meio rico contendo cloreto de sódio ou cloreto de potássio, desta forma produzindo conídios altamente tolerantes a outras formas de estresse, entretanto, esta indução fisiológica produz baixa quantidade de conídios (RANGEL et al., 2012; RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2008; RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2006). Os fungos entomopatogênicos que vivem no solo são geralmente oligotróficos, e portanto, podem crescer as custas de baixos níveis de carboidratos e nitrogênio (RANGEL et al., 2015a).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho é avaliar a influência da exposição da luz visível e diferentes concentrações de oxigênio no aumento da tolerância a diferentes estresses físicos e químicos em dez espécies de fungos entomopatogênicos.

Objetivos específicos

Como objetivos específicos, procurou-se determinar:

- a) Os requerimentos energéticos de luz e limite para fotoativação de fungos induzindo aumento de tolerância dos conídios;
- b) As tolerâncias à radiação ultravioleta (UV) solar, cloreto de potássio (KCl) e 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) de conídios produzidos sob luz branca e no escuro;
- c) As tolerâncias à radiação UV, KCl e 4NQO de conídios produzidos sob condições de hipoxia e anoxia;
- d) Se o crescimento do micélio em diferentes comprimentos de onda da luz visível: e.g, azul (440-445 nm), verde (500-570 nm) e vermelho (620-730 nm) induz aumento de tolerância ao estresse osmótico e a radiação UV;
- e) A expressão de genes que estão provavelmente envolvidos na indução da tolerância ao estresse quando conídios de fungos entomopatogênicos são produzidos sob o escuro, luz branca, luz azul, luz vermelha, luz verde, meio mínimo (MM), hipoxia e anoxia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Etapas do estudo

Para melhor compreensão de todo o processo, o estudo foi dividido em cinco etapas:

Primeira etapa: Foi necessário definir o limiar de fotoativação. Nesse estudo foi utilizado apenas o isolado *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575), que é utilizado como modelo e já tem estudos relatados ao efeito de luz. O isolado foi crescido em diferentes luminosidades, onde foi avaliado a germinação, a tolerância ao estresse osmótico causado pelo cloreto de potássio (KCl) (Figura 2a).

Segunda etapa: Após definir a quantidade de energia necessária. Os dez isolados de fungos entomopatogênicos foram crescidos sob o escuro, luz branca, estresse nutricional (MM), respectivamente. Posteriormente, foi avaliada a sobrevivência quanto a tolerância à radiação UV, estresse osmótico pelo cloreto de potássio (KCl) e estresse causado pelo agente genotóxico 4NQO (Figura 2b).

Terceira etapa: Foi estudado apenas o isolado *M. robertsii* (ARSEF 2575). O isolado foi crescido sob a luz branca, azul, vermelha e verde, e foi avaliada a tolerância à radiação UV e o estresse osmótico (Figura 2c).

Quarta etapa: No quarto experimento, os dez isolados de fungos entomopatogênicos foram crescidos sob estresse nutricional (MM), normoxia, estresse hipóxico e anóxico, respectivamente. Posteriormente, foi avaliada a sobrevivência quanto a tolerância à radiação UV, estresse osmótico e estresse causado pelo agente genotóxico 4NQO (Figura 2d).

Quinta etapa: No quinto experimento, o foi utilizado o isolado *M. robertsii* (ARSEF 2575), que apresentou ótimos resultados quanto ao aumento de tolerância aos estresses quando crescido sob a luz visível, hipóxia e anoxia. Foi analisado a expressão dos genes que estão provavelmente envolvidos na indução da tolerância ao estresse quando conídios foram produzidos sob o escuro, luz branca, luz azul, luz verde, luz vermelha, MM, hipoxia e anoxia (Figura 2e).

Figura 2 – Fluxograma das etapas experimentais: (a) Primeira etapa; (b) Segunda etapa; (c) Terceira etapa; (d) Quarta etapa. (e) Quinta etapa.

a) Primeira etapa:

b) Segunda etapa:

c) Terceira etapa:

d) Quarta etapa:

e) Quinta etapa:

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2 Isolados

Foram utilizados dez isolados de fungos entomopatogênicos obtidos da USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF; Robert W. Holley Center for Agriculture & Health, Ithaca, NY, USA) (Tabela 1). Os fungos foram mantidos a 26 °C em placas de Petri (90 cm×15 cm) em meio BDA (Batata Dextrose Agar, Difco™) com o pH ajustado a 6.9. Os isolados foram escolhidos de acordo com a pigmentação sendo que os isolados *Metarhizium brunneum* (ARSEF 1187), *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575) e *Metarhizium anisopliae* (ARSEF 5749) possuem a coloração verde escura, o isolado *Beauveria bassiana* (ARSEF 252) possui coloração branca, os isolados *Tolypocladium cylindrosporum* (ARSEF 3392), *Tolypocladium inflatum* (ARSEF 4877), *Lecanicillium aphanocladii* (ARSEF 6433) e *Simplicillium lanosoniveum* (ARSEF 6651) apresentam a coloração hialina, o isolado *Isaria fumosorosea* (ARSEF 3889) apresenta de coloração lilás e o isolado *Aschersonia aleyrodinis* (ARSEF 10276) apresenta coloração laranja, sendo o único isolado a produzir o pigmento carotenoide (Tabela 1).

Tabela 1 - Linhagens de fungos entomopatogênicos

#	Isolados	Epécies	Substrato/Hospedeiro	Origem geográfica	Ano
1	ARSEF 252	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> [Coleoptera: Chrysomelidae]	Orono, Maine, USA	1978
2	ARSEF 1187	<i>Metarhizium brunneum</i>	<i>Oxyacan</i> sp. [Lepidoptera: Hepialidae]	Palmerston North, New Zealand	1966
3	ARSEF 2575	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>Curculio caryae</i> [Coleoptera: Curculionidae]	South Carolina, USA	1988
4	ARSEF 3392	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	Solo	Nepal	1991
5	ARSEF 3889	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Bemisia tabaci</i> [Homoptera: Aleyrodidae]	Hawaii, USA	1993
6	ARSEF 4877	<i>Tolypocladium inflatum</i>	[Coleoptera: Scarabaeidae: Aphodiinae]	Danby, New York, USA	1994
7	ARSEF 5749	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	<i>Schistocerca piceifrons</i> [Orthoptera: Acrididae]	Cerro de Ortega, Colima, Mexico	1992
8	ARSEF 6433	<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Triângulo Agroindustrial S.A.	Pontes e Lacerda, Mato Grosso, Brazil	2001
9	ARSEF 6651	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	<i>Leptopharsa heveae</i> [Hemiptera: Tingidae]	French Guiana	2000
10	ARSEF 10276	<i>Aschersonia aleyrodinis</i>	Cochonilhas em goiabeira	São José dos Campos, SP, Brazil	2011

Fonte: Arquivo pessoal

4.3 Meios de cultura e condições de cultivo

Os conídios foram retirados da cultura estoque de cada isolado mantida a 4 °C em tubos de ensaio com o meio batata dextrose agar (BDA) (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) e suspensos em 1 mL de solução estéril de Tween 80 (0,01% v/v) [Sigma-Aldrich Corporation, EUA] em microtubos de 1,5 mL.

Os conídios foram produzidos em 23 mL dos meios de cultura BDA ou meio mínimo (MM) [0,2% de NaNO₃, 0,1% de K₂HPO₄, 0,05% de MgSO₄, KCl de 0,05%, 0,001% de FeSO₄ e 1,5% de Bacto Agar (Becton, Dickinson e CO, USA)] em placas de Petri de poliestireno (95 × 15 mm). O crescimento sob estresse nutritivo foi usado como controle positivo, uma condição que sempre produzirá em *M. robertsii* (ARSEF 2575) conídios com alta tolerância ao estresse (RANGEL et al., 2012; RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2008). O pH de todos os meios foi ajustado para 6.9.

De cada suspensão de conídios, o inóculo de 100 µl (1 x 10⁷ conídios ml⁻¹) foi uniformemente espalhado na superfície do meio de cultura. As culturas foram incubadas a 26 ± 1 °C e aproximadamente 90% de umidade relativa (UR) por 14 dias. Três diferentes lotes de conídios foram produzidos, um para cada replicata de cada tipo de estresse experimental.

4.4 Requerimentos energéticos e limiar para fotoativação utilizando diferentes intensidades de luz branca em *Metarhizium robertsii*

A fim de verificar qual o requerimento energético necessário e o limite para a fotoativação, foi analisado a influência de diferentes intensidades de luz branca no isolado *Metarhizium robertsii*, que é considerado modelo de estudos e já apresentou aumento de tolerância quando crescido sob a luz branca constante (RANGEL et al., 2011). Neste item, foi avaliado a germinação e o aumento de tolerância ao estresse osmótico causado pelo KCl.

Foram utilizadas duas incubadoras de crescimento que possuem diferentes intensidades de luz, conforme a seguir:

1) Tratamento de luz na incubadora Marconi. As placas de Petri com culturas em meio BDA com tampas no lugar, em uma única camada (não empilhadas) foram mantidas sob luz contínua fornecida por duas lâmpadas fluorescente de amplo espectro Philips 15 W branco frio (TL-D 15 W/75-650) suspensas a uma distância de 25 cm acima das amostras. Um filme de 0.13-mm de diacetato de celulose cobriu as placas para evitar a desidratação do meio. A

irradiância integrada das lâmpadas que passaram através da película de diacetato mais a tampa da placa Petri foi $4,98 \text{ W m}^{-2}$.

2) Tratamento de luz na incubadora Panasonic. As placas de Petri com culturas em meio BDA com tampas no lugar, em uma única camada (não empilhado) foram mantidos sob luz contínua ajustado para 1 lumen (irradiância integrado de $2,2 \text{ W m}^{-2}$), 3 lumens (integrated irradiância integrado de $6,04 \text{ W m}^{-2}$), 4 lumens (irradiância integrado de $15,74 \text{ W m}^{-2}$), and 5 lumens (irradiância integrado de $28,09 \text{ W m}^{-2}$).

A irradiância espectral do equipamento das câmaras foi medida com um espectralradiômetro Ocean Optics (Dunedin, FL) modelo USB2000 + Rad (Figura 3). As leituras foram tomadas no nível das colônias de fungos com placas de Petri com tampas de poliestileno e um filme de 0,13-mm de diacetato de celulose no caminho da luz para evitar a dissecação do meio.

Para tratamentos no escuro, todas as placas de Petri foram mantidas na mesma incubadora do tratamento de luz, mas as placas de Petri foram mantidas dentro de uma caixa de plástico coberta com uma espessa manta de pano preto.

Figura 3 - Leituras do espectroradiômetro do par de lâmpadas fluorescentes (Philips, 15W branco fresco) da incubadora Marconi.

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Leituras do espectroradiômetro na incubadora Panasonic MLR 352HPA ao nível de 1, 3, 4, 5 lumens. As leituras foram tomadas em nível das colônias de fungos com placas de Petri com tampas de poliestileno e um filme de 0,13-mm de diacetato de celulose no caminho da luz.

4.4.1 Germinação de conídios em diferentes intensidades de luz branca em *Metarhizium robertsii*

Conídios do isolado *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575), foram produzidos no escuro em 23 mL dos meios de cultura batata dextrose agar (BDA) ou meio mínimo (MM) por 14 dias a 26 ± 1 °C. O pH foi ajustado para pH 6.9.

Após 14 dias de crescimento os conídios foram coletados com o auxílio de alça microbiológica e suspensos em 10 ml de solução esterilizada de tween 80 (0,01 % v/v) em em tubos Pyrex com tampa roscada (20 x 125 mm). As suspensões foram ajustadas (1×10^5 conídios ml^{-1}), e em seguida agitadas. As suspensões de conídios (40 μl) foram inoculadas (sem espalhar) no centro das placas de polietileno (60 x 15 mm) contendo 8 ml de BDA.

Em seguida, as placas foram incubadas à 28 ± 1 °C em seis diferentes tratamentos: 1) crescimento em meio mínimo (MM) na incubadora Panasonic no escuro; 2) crescimento em meio mínimo (MM) na incubadora Panasonic sob luz branca contínua com a intensidade de 5 Lumens; 3) crescimento em meio BDA na incubadora Panasonic no escuro; 4) crescimento em meio BDA na incubadora Panasonic sob luz branca contínua luz com a intensidade de 5 Lumens; 5) crescimento em meio BDA na incubadora Marconi no escuro; 6) crescimento em meio BDA na incubadora Marconi sob luz branca contínua. As placas foram cobertas com filme de 0,13-mm de diacetato de celulose para evitar a dissecação do meio. A contagem de germinação de conídios foi realizada após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 horas.

4.4.2 Tolerância de conídios produzidos em diferentes intensidades de luz branca ao estresse osmótico em *Metarhizium robertsii*

Tolerância ao estresse osmótico de conídios produzidos no escuro, sob luz branca e sob estresse nutritivo.

Em fungos entomopatogênicos, múltiplos mecanismos especificamente envolvidos na aclimação à hemolinfa de insetos incluem mudanças dramáticas no acúmulo de solutos que aumentam a pressão osmótica interna (WANG; ST. LEGER, 2006). Consequentemente, os fungos patogênicos de insectos têm de lidar continuamente com este tipo de estresse. Assim, estudamos as tolerâncias dos conídios produzidos no escuro, sob a luz e sob o estresse nutritivo ao estresse osmótico pelo cloreto de potássio. Conídias produzidas no escuro, sob

a luz, ou sob estresse nutritivo (MM) foram expostas a estresse osmótico utilizando cloreto de potássio da Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, Missouri, EUA).

O fungo foi cultivado a 26 ± 1 °C durante 14 dias, em cinco tratamentos: 1) crescimento em meio mínimo (MM) no escuro; 2) crescimento em meio BDA na incubadora Marconi; 3) crescimento em meio BDA sob luz branca contínua na incubadora Marconi. 4) crescimento em meio (BDA) no escuro na incubadora Panasonic; 5) crescimento em meio BDA sob luz branca contínua na incubadora Panasonic; Para a incubadora Panasonic, quatro intensidades de luz foram estudados com 1, 3, 4, e 5 lumens.

Conídios de culturas com 14 dias foram coletados com o auxílio de alça microbiológica e foram suspensos em 10 ml de solução esterilizada de tween 80 (0,01 % v/v) em tubos Pyrex com tampa roscada (20 x 125 mm). As suspensões foram ajustadas (1×10^5 conídios ml^{-1}), e em seguida agitadas.

As suspensões de conídios (40 μl) foram inoculadas (sem espalhar) no centro das placas de polietileno (35 x 10 mm Greiner Bio-One) contendo 4 ml de BDA (controle = 0) ou BDA com a adição de cloreto de potássio (Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, Missouri, USA). As concentrações de KCl utilizados foram 1.3; 1.4; 1.5; 1.7 e 1.9 M de KCl. A contagem de germinação de conídios foi realizada após 24 horas a 26 ± 1 °C. Todos isolados foram testados ao mesmo tempo para cada repetição, totalizando três repetições.

4.5 Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

Conídios dos dez isolados de fungos foram cultivados como se segue: 1) Em meio batata dextrose agar (BDA) crescido no escuro (controle) ou 2) em meio BDA crescido sob luz branca contínua (400-700 nm) durante o período de incubação, e 3) sob estresse nutritivo (MM) no escuro. O crescimento sob a luz branca foi realizado sob duas lâmpadas fluorescente de amplo espectro Philips 15 W branco fresco (TL-D 15 W/75-650) suspensas a uma distância de 25 cm acima das amostras. Um filme de 0,13-mm de diacetato de celulose cobriu as placas para evitar a desidratação do meio (Figura 4). A irradiância integrada das lâmpadas que passaram através da película de diacetato mais a tampa da placa Petri foi 4.98 W m^{-2} . Todos os isolados foram crescidos a $26 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ por 14 dias.

Figura 4 - Leituras do espectroradiômetro do par de lâmpadas fluorescentes (Philips, 15W branco fresco).

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: As leituras foram tomadas em nível das colônias de fungos com placas de Petri com tampas de poliestileno e um filme de 0,13-mm de diacetato de celulose no caminho da luz.

4.5.1 Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV

Neste estudo, utilizamos o equipamento Xenon Test Chamber Q-SUN XE-3-HC 340S (Q-LAB® 18 Corporation, Westlake, OH, EUA). A câmara de teste de xenônio reproduz todo o espectro de radiação solar no ultravioleta (UV), visível e infravermelho (IR), de 295 nm a 800 nm, usando lâmpadas de arco xenon e filtros ópticos. Utiliza três lâmpadas de xenônio para uma grande capacidade de amostragens. A irradiância das três lâmpadas é refletida pelas paredes espelhadas dentro do equipamento, que 1 h gera a mesma energia em toda a superfície de irradiação. Além disso, o Q-SUN pode simular a radiação solar de todas as estações, bem como de manhã, meio-dia e tarde, irradiações solares.

Conídios de culturas com 14 dias crescidos em meio de cultura BDA, foram coletados com o auxílio de alça microbiológica e foram suspensos em 10 ml de solução esterilizada de tween 80 (0,01 % v/v) em tubos Pyrex com tampa roscada (20 x 125 mm). As suspensões ($1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) foram ajustadas, e em seguida agitadas.

As suspensões de conídios (40 μl) foram inoculadas (sem espalhar) no centro das placas de polietileno (35 x 10 mm Greiner Bio-One) contendo 6 ml de BDA suplementado com 0,003 % (p/v) de benomil (Hi-yield Chemical Company, Bonham, Tx). As placas foram mantidas abertas no fluxo laminar por 30 minutos para secar as suspensões de conídios.

Após a secagem da suspensão sobre o meio de cultura, as placas foram expostas no equipamento Xenon Test Chamber Q-SUN XE-3-HC 340S, para simular a radiação solar na com o filtro Daylight-Q. Os filtros Daylight são usados para simular a luz solar direta, e eles

fornece a melhor correlação para exposições externas naturais para a maioria das aplicações. As calibrações de luz e temperatura do Q-SUN foram feitas a cada 50 horas.

As placas foram cobertas com filtros de diacetato de celulose de 0,13 mm (JCS Industries, Le Miranda, CA, EUA), para reduzir a dessecação do meio. Os filtros de diacetato de celulose foram utilizados para excluir a radiação UV-C e UV-B de curto comprimento de onda em estudos anteriores (BRAGA et al., 2001c; RANGEL et al., 2012). Mesmo que o Q-SUN produz irradiações realistas para irradiações solares, sem UV-C e UV-B de onda curta, este filtro foi usado para evitar a dessecação do meio porque o Q-SUN possui um fluxo de ar positivo para reduzir a temperatura.

O Q-SUN foi calibrado com o filtro de diacetato no topo do sensor de calibração. O dano do DNA (formação de ciclobutano de pirimidina) espectro de ação desenvolvido por Quate, Sutherland e Sutherland (1992), e normalizado a unidade a 300 nm, foi utilizado para calcular irradiações UV ponderadas em mW m^{-2} e, conseqüentemente, essas irradiações UV ponderadas foram utilizados para calcular as fluências no kJ m^{-2} . A irradiância ponderada dentro da câmara foi de 1335 mW m^{-2} , que é semelhante às irradiações espectrais de radiação solar (Quate = 1300 mW m^{-2}) ao meio-dia sob céu claro registrado no verão (13 de dezembro de 2011) em São José dos Campos, estado de São Paulo, no Brasil, localizado à latitude $23^{\circ}13'00''\text{S}$ de longitude $45^{\circ}58'05''\text{W}$ e 588 m de altitude.

As placas de Petri contendo a suspensão dos isolados foram expostas por 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 e 210 minutos, equivalentes às irradiâncias de 8.01, 8.81, 9.61, 10.41, 11.21, 12.01, 12.82, 13.62, 14.42, 15.22, 16.02, e 16.82 kJ/m^2 , respectivamente. As placas de Petri com a suspensão de conídios do controle foram colocadas na câmara por 210 minutos e cobertas com papel alumínio.

As placas irradiadas foram incubadas no escuro a 26°C por 48 horas, as placas controle foram mantidas a 26°C no escuro por 24 horas.

O equipamento foi ajustado a irradiância de 0.60 W/m^2 . A temperatura do equipamento foi ajustada para 18°C (*black panel*) e 16°C (*chamber air*). As temperaturas medidas pelos termômetros black panel e chamber air do equipamento foram $17,8 \pm 1,02$ e $19,3 \pm 0,90^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A temperatura média medida por um termômetro (Hanna Instruments, Mauritius) externo com sonda dentro do equipamento durante a irradiação foi de $29,4 \pm 1,96^{\circ}\text{C}$.

A irradiância espectral do equipamento QSUN[®] Xenon Test Chamber XE3 foi medida com um espectralradiômetro Ocean Optics (Dunedin, FL, EUA) modelo USB2000 + Rad (Figura 5).

Figura 5 - Irradiância espectral do equipamento QSUN[®] Xenon Test Chamber XE3.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.5.2 Influência da luz branca no aumento da tolerância ao estresse osmótico

Para o preparo do inóculo para o experimento do estresse osmótico, conídios de culturas com 14 dias foram coletados com o auxílio de alça microbiológica e foram suspensos em 10 ml de solução esterilizada de tween 80 (0,01 % v/v) em tubos Pyrex com tampa roscada (20 x 125 mm). As suspensões (1×10^5 conídios ml^{-1}) foram ajustadas, e em seguida agitadas.

As suspensões de conídios (40 μl) foram inoculadas (sem espalhar) no centro das placas de polietileno (35 x 10 mm Greiner Bio-One) contendo 4 ml de BDA (controle = 0) ou BDA com a adição de cloreto de potássio (Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, Missouri, USA). As concentrações utilizados foram 0.9; 1.0; 1.3; 1.4; 1.5; 1.7; 1.9; 2.1; 2.4 M de KCl. As placas foram produzidas e inoculadas no mesmo dia e incubadas por 24h a 26 ± 1 °C. A contagem de germinação de conídios foi realizada após 24 horas de incubação. Todos isolados foram testados ao mesmo tempo para cada repetição, totalizando três repetições.

4.5.3 Influência da luz branca no aumento da tolerância ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

Uma solução-mãe de 26,155.50 μM de 4-NQO (Sigma-Aldrich Brasil) foi produzido usando toda a garrafa de 1 g do produto, diluiu-se em etanol 99%, e armazenado a 5 °C em

um frasco âmbar. Uma segunda solução estoque foi diluída em etanol 99% a uma concentração de 1,000 μM 4-NQO, e armazenou 5 °C em um frasco da âmbar. Esta solução de reserva foi utilizada para preparar uma solução a 100 μM em água destilada e esta diluição foi utilizada para preparar o meio suplementado com 4-NQO. Todas as soluções foram armazenadas a 5 °C.

Para o preparo do inóculo para o experimento, conídios de culturas com 14 dias crescidos em meio de cultura BDA, foram coletados conídios de culturas com 14 dias com alça microbiológica e foram suspensos em 10 ml de solução esterilizada de tween 80 (0,01% v/v) em tubos Pyrex com tampa roscada (20 x 125 mm). As suspensões foram ajustadas ($1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$), e em seguida agitadas.

As suspensões de conídios (40 μl) foram inoculadas (sem espalhar) no centro das placas de polietileno (35 x 10 mm Greiner Bio-One) contendo 4 ml de BDA (controle = 0) ou BDA com a adição de concentrações de 0.5; 0.7; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0 μM de 4NQO μM . As placas foram produzidas e inoculadas no mesmo dia e incubadas por 24h a 26 ± 1 °C. A contagem de germinação de conídios foi realizada após 24 horas de incubação. Todos isolados foram testados ao mesmo tempo para cada repetição, totalizando três repetições.

4.6 Influência da luz azul, vermelha e verde no aumento da tolerância à radiação UV e ao estresse osmótico em *Metarhizium robertsii*

Conídios foram cultivados como se segue: 1) Em meio (BDA) crescido no escuro (controle); 2) em meio BDA crescido sob (A) luz branca (irradiância 4.98 W m^{-2} 2230 lux); (B) luz azul (irradiância integrada de $4,8 \text{ W m}^{-2}$ e 645,5 lux); (C) luz verde (irradiância integrada de $2,2 \text{ W m}^{-2}$ e 2602 lux); (D) luz vermelha (irradiância integrada de $2,8 \text{ W m}^{-2}$ e 53 lux); (E) luz azul (irradiância integrada de $9,7 \text{ W m}^{-2}$ e 1770,6 Lux²) e 3) sob nutricional estresse (MM) no escuro.

O crescimento sob a luz branca foi realizado sob lâmpada fluorescente Sylvania 15 W a uma distância de 30 cm da placa de Petri. As placas foram cobertas com filme de 0,13-mm de diacetato de celulose para evitar a dissecação do meio. Todos os isolados foram crescidos a $26 \text{ °C} \pm 1\text{°C}$ por 14 dias.

Para o tratamento de luz azul, verde ou vermelha, as placas de Petri com culturas em meio BDA com tampas, em uma única camada (não empilhadas) foram mantidas sob luz

contínua azul, verde ou vermelha fornecida por três incubadoras que foram ajustadas para permitirem a incubação das culturas sob diferentes comprimentos de onda da luz. A Incubadora 1 com quatro lâmpadas Led LLUM® E27 5W (Jinli Lighting Co., China), configuradas no comprimento de onda azul, fornecendo uma irradiação integrada de 4,8 W m⁻² e 645,5 lux. Incubadora 2 com quatro lâmpadas Led LLUM® E27 5W ajustadas no comprimento de onda verde fornecendo uma irradiação integrada de 2,2 W m⁻² e 2602 lux. Incubadora 3 com quatro lâmpadas Led LLUM® E27 5W configurado no comprimento de onda vermelho fornecendo uma irradiação integrada de 2,8 W m⁻² e 53 lux. A distância entre os LEDs e as placas de ágar foi de 6 cm e a temperatura das incubadoras foi ajustada para 26 ° C ± 1°C. As irradiações espectrais (em W m⁻²) das incubadoras foram medidas com um espectroradiômetro Ocean Optics (Dunedin, FL) Modelo USB2000 + Rad (Figura 6), e a iluminância (em lux) das incubadoras foi medida com um registrador de dados HOBO® U12-012. Nenhum efeito de aquecimento pelos LEDs pode ser detectado.

Para tratamentos de luz azul, as placas foram incubadas em uma câmara de crescimento E-30LED equipada com diodos emissores de luz azuis (Percival Scientific, Inc., Perry, IA), que forneceu uma irradiação integrada de 9,7 W m⁻² e 1770,6 Lux. Todas as incubações foram realizadas a 26 ° C ± 1°C.

Para tratamentos escuros, todas as placas de Petri foram mantidas na mesma incubadora do nível de tratamento, mas as placas de Petri foram mantidas dentro de uma caixa de plástico coberta com uma espessa manta de pano preto.

Figura 6 - Leituras do espectroradiômetro do par de lâmpadas fluorescentes (Philips, 15W branco fresco).

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: As leituras foram tomadas em nível das colônias de fungos com placas de Petri com tampas de poliestileno e um filme de 0,13-mm de diacetato de celulose no caminho da luz.

Figura 7 - Irradiância espectral dos comprimentos de luz azul, verde e vermelha.

Fonte: Arquivo pessoal

Notas: As leituras foram tomadas em nível das colônias de fungos com placas de Petri com tampas de poliestileno e um filme de 0,13-mm de diacetato de celulose no caminho da luz.

Após 14 dias de crescimento, foi avaliado a tolerância à radiação UV conforme metodologia descrita no item (4.4.1). Entretanto, os tempos de irradiação foram ajustadas para 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 a 210 minutos.

Após 14 dias, foi avaliado a tolerância ao estresse osmótico conforme metodologia descrita no item (4.4.2). Entretanto, as concentrações foram ajustadas para 1.0; 1.3; 1.4; 1.5; 1.7; 1.9; 2.1 de KCl.

4.7 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

Os experimentos foram realizados da seguinte forma: a) **Controle**: o crescimento micelial em placas de Petri com meio de BDA em condições normais de oxigênio por 14 dias (condição normóxica); b) **Condição hipóxica**: culturas em placas de Petri com meio BDA foram selados três vezes com Parafilm® e mantido por 14 dias (de acordo com (FAYZALLA; SHABANA; MAHMOUD, 2008; SHABANA; ELWAKIL; CHARUDATTAN, 2001)); c) **Condição anóxica**: as placas de Petri com meio BDA foram inoculadas com os dez isolados e mantidas em condições normóxicas por dois dias. No segundo dia de crescimento foram transferidas para jarra de anaerobiose (BD GasPak™ EZ) com indicador de anaerobiose por cinco dias. No quinto dia as placas foram transferidas para condições de normoxia por mais sete dias. d) **Condição de estresse nutritivo**: Os fungos

foram inoculados em Placas de Petri com meio mínimo (MM), sob condição normóxica. As culturas foram incubadas a 26 ± 1 °C durante 14 dias.

Todos isolados foram testados ao mesmo tempo para cada repetição, totalizando três repetições.

4.7.1 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV

Após 14 dias, foi avaliado a tolerância ao estresse osmótico conforme metodologia descrita no item (4.5.1).

4.7.2 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância ao estresse osmótico

Após 14 dias, foi avaliado a tolerância ao estresse osmótico conforme metodologia descrita no item (4.5.2). As concentrações foram 0.9; 1.0; 1.3; 1.4; 1.5; 1.7; 1.9; 2.1; 2.4 M de KCl.

4.7.3 Influência de Hipoxia e Anoxia tolerância ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

Após 14 dias, foi avaliado a tolerância ao estresse osmótico conforme metodologia descrita no item (4.5.3). As concentrações foram 0.5; 0.7; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0 μ M de 4NQO

4.8 Avaliação da germinação em todas as etapas experimentais

Após o período de incubação, para a contagem, a placa de ágar foi corada no ponto da inoculação com uma gota de solução de azul de metileno (BRAGA et al., 2002), foi coberta com uma lâmina e examinada em microscópio óptico com aumento de 400x. Os conídios foram considerados germinados quando um tubo germinativo projetado do conídio foi visível (MILNER; HUPPATZ; SWARIS, 1991). Foram avaliados pelo menos 300 conídios por placa e a porcentagem de germinação foi calculada conforme descrito por Braga et al., 2001. Todos os conídios em germinação ou não germinativos foram contados em uma única lâmina. O padrão de varredura para a contagem foi em torno da margem da suspensão

conidial, que é uma área comumente menos povoada por conídios. Cada tratamento foi repetido pelo menos três vezes com um novo lote de conídios produzido para cada repetição.

4.9 Análises de expressão gênica

A análise de expressão gênica fornece o conhecimento sobre como os fungos percebem tensões e respondem ao seu ambiente. Neste trabalho, o experimento foi realizado apenas com o isolado *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575), devido aos bons resultados quanto a influência da luz e diferentes concentrações de oxigênio na tolerância à radiação UV e KCl, além disso, o isolado possui o genoma sequenciado.

Um conjunto de genes geralmente envolvidos em diferentes respostas ao estresse foram selecionados para estudar seus padrões de expressão, incluindo genes marcantes de estresse oxidativo, como superóxido dismutases (Mrsod1 e Mrsod2) e catalase citosólica (MrcatC), estresse por calor, como proteínas de choque térmico (Mrhsp30 e Mrhsp101), estresse geral, como a trehalose-fosfato sintase (Mrtps) e as fotoliasas envolvidas na reparação do DNA após o dano UV (Mr6-4phr e MrCDPphr). Foi estudado os níveis de expressão do gene *hydrophobin starvation stress* (Mrssga) e o gene de protease Mrpr1, dois genes potencialmente envolvidos no estresse causado durante a adesão e degradação das cutículas de insetos, estágios iniciais do processo de infecção.

O padrão de expressão dos genes foi estudado por PCR em tempo real (RT-qPCR) pelo Dr. Nicolas Pedrini (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata). Os padrões de expressão foram obtidos quando o fungo foi cultivado sob condições de luz branca, luz azul, luz vermelha, luz verde, hipoxia, anoxia e MM, e foram comparados com aqueles cultivados em ambientes escuros crescidos em normoxia.

O RNA total foi obtido a partir de fungos cultivados nas diferentes condições de luz mencionadas anteriormente, incluindo condições escuras (controle). As células fúngicas foram trituradas em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído usando o kit RNAeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha) com um passo de digestão do DNA na coluna (DNase I, Qiagen). O RNA foi quantificado por um espectrofotômetro Nanodrop (Thermo, Wilmington, EUA) e sua integridade avaliada em uma eletroforese em gel de agarose a 1% (p / v). O cDNA de cadeia simples foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), que inclui um passo de eliminação de qualquer DNA genômico restante. O cDNA foi então amplificado usando um Kit de PCR QuantiFast SYBR Green (Qiagen) em um sistema de PCR Tempo-OutOnePlus Real-Time

(Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) com a condição de ciclagem térmica universal fornecida pelo fabricante. A fim de confirmar que apenas os produtos únicos foram amplificados, um passo de fusão de temperatura foi então realizado. Os controles negativos foram testados usando modelos gerados sem transcriptase reversa. As reações contendo pares de iniciadores sem modelo também foram incluídas como controles em branco. O ensaio foi feito em duplicatas técnicas para cada uma das três repetições biológicas independentes realizadas. Foram obtidas curvas padrão para avaliar a eficiência de PCR de cada par de iniciadores utilizados e o método Ct comparativo foi empregado para quantificação relativa. As análises estatísticas foram realizadas com o software REST (versão 2009, Qiagen) (PFAFFL, 2002). O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Mrgpd) foi utilizado como gene housekeeping. Os primers utilizados e as eficiências de PCR estão detalhadas na Tabela 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Primers utilizados

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Mrsod1</i>	CCAATGGCTGCACTTCTGCTGG	TGTGAGGGCCGATGAGCTTGAC
<i>Mrsod2</i>	CCAGCATCTCGGCGCAAATC	CGCCGCCGTTGAACTTGATG
<i>Mrtps</i>	TTCAAGTGGGCCAACAACTC	CACACCTTGTGATAATGTAGC
<i>Mr6-4phr</i>	TCGCCGTTTCTTCACTTTGGTG	TCTGCGTAACTTGGCACCGAC
<i>Mrssga</i>	GTGTATTGCTGCAACAAAG	AGACCATTTTGCTGGACATTG
<i>Mrhsp101</i>	GCTATTCTCATTCTCCGAAACA	CATCCTCCATCATATCATCATC
<i>MrCDPphr</i>	CATGCCGATTTGGACTTGCTTG	TGGAACAGCGCAATCAAACAGG
<i>Mrcatc</i>	AATGGCGGCCTAGTCACCTTGG	TCGAGATGCGGGTCAAGATTGG
<i>Mrhsp30</i>	AGCAGAACCCAAAGGCCAGTC	GCCAGCGGTATAGGATCTCTCG
<i>Mrpr1</i>	GATTGGTGGCAGCACTAA	TCCTGGATCTTCTTGCAAAG
<i>Mrgpd</i>	GACTGCCCGCATTGAGAAG	AGATGGAGGAGTTGGTGTG

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 3 - Valores de E e R² da regressão linear por diluições dos genes alvos e de referência de *M. robertsii* (ARSEF 2575)

Gene	E (%)	R ²
<i>Mrsod1</i>	107.9	0.999
<i>Mrsod2</i>	118.1	0.990
<i>Mrtps</i>	103.5	0.998
<i>Mr6-4 phr</i>	121.1	0.988
<i>Mrssga</i>	115.6	0.987
<i>Mrhsp101</i>	133.3	0.994
<i>MrcatB</i>	120.3	0.992
<i>MrcatC</i>	105.9	0.992
<i>Mrhsp30</i>	106.4	0.988
<i>Mrpr1</i>	104.4	0.996
<i>Mrgpd</i>	116.5	0.989

Fonte: Arquivo pessoal

4.10 Análise estatística

4.10.1 Requerimentos energéticos e limite para fotoativação utilizando diferentes intensidades de luz branca em *Metarhizium robertsii*

Nas análises de requerimentos energéticos e limite para fotoativação utilizando diferentes intensidades de luz branca, foram realizadas análises de germinação por 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 horas em diferentes intensidades de luz branca, cujos fatores foram as luminosidades com seis diferentes tratamentos: 1) crescimento em meio mínimo (MM) no escuro; 2) crescimento em meio mínimo (MM) sob luz branca constante na intensidade de 5 Lumens; 3) crescimento em meio BDA na incubadora Marconi; 5) crescimento em meio BDA sob luz branca contínua na incubadora Marconi. 5) crescimento em meio (BDA) no escuro na incubadora Panasonic; 6) crescimento em meio BDA sob luz branca contínua na incubadora Panasonic). Para cada tratamento teve 3 repetições.

Para a análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Os resultados foram submetidos a análise de variância, aplicando-se o teste F. O teste Tukey ($p < 0,05$), foi empregado para comparação das médias.

4.10.2 Germinação de conídios em diferentes intensidades de luz branca em *Metarhizium robertsii*

Na tolerância de conídios produzidos em diferentes intensidades de luz branca ao estresse osmótico causado pelo KCl, os fatores foram as luminosidades em cinco tratamentos: 1) crescimento em meio mínimo (MM) no escuro; 2) crescimento em meio BDA na incubadora Marconi; 3) crescimento em meio BDA sob luz branca contínua na incubadora Marconi. 4) crescimento em meio (BDA) no escuro na incubadora Panasonic; 5) crescimento em meio BDA sob luz branca contínua na incubadora Panasonic; Para a incubadora Panasonic, quatro intensidades de luz foram estudados com 1, 3, 4, e 5 lumens. Para cada tratamento teve 3 repetições.

Para a análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Os resultados foram submetidos a análise de variância, aplicando-se o teste F. O teste Tukey ($p < 0,05$), foi empregado para comparação das médias.

4.10.3 Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

Para analisar a influência da luz branca no aumento da tolerância ao estresse causado pela radiação UV, estresse osmótico pelo cloreto de potássio (KCl) e pelo 4NQO, foi realizada uma análise com um arranjo fatorial inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas, cujos fatores foram as luminosidades com 3 diferentes condições (dark, light e meio mínimo).

Para a radiação UV foram utilizados 13 tempos de exposição (0, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 e 210 min), para o estresse osmótico foram utilizadas 10 concentrações (0, 0.9, 1.0, 1.3, 1.4, 1.5, 1.7, 1.9, 2.1, 2.4 M) e para o 4NQO foram utilizadas 16 concentrações (0.0, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 μ M). Cada estresse teve 3 repetições.

Para a análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Os resultados foram submetidos a análise de variância, aplicando-se o teste F. O teste Tukey ($p < 0,05$), foi empregado para comparação das médias.

4.10.4 Influência da luz azul, vermelha e verde no aumento da tolerância à radiação UV e ao estresse osmótico em *Metarhizium robertsii*

Para analisar a influência da luz azul, vermelha e verde no aumento da tolerância ao estresse causado pela radiação UV e pelo estresse osmótico, foi realizada uma análise com um arranjo fatorial inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas, cujos fatores foram as luminosidades com 7 diferentes condições (escuro, luz branca, azul, azul percival, verde, vermelha e MM).

Para a radiação UV foram utilizados 12 tempos de exposição (0, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 e 210 min), para o estresse osmótico pelo cloreto de potássio foram utilizadas 9 concentrações (0, 1.0, 1.3, 1.4, 1.5, 1.7, 1.9, 2.1, 2.4 M). Cada estresse teve 3 repetições.

Para a análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Os resultados foram submetidos a análise de variância, aplicando-se o teste F. O teste Tukey ($p < 0,05$), foi empregado para comparação das médias.

4.10.5 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

Para avaliar a influência da hipóxia e anoxia no aumento da tolerância ao estresse causado pela radiação UV, estresse osmótico pelo cloreto de potássio (KCl) e pelo 4NQO, foi realizada uma análise com um arranjo fatorial inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas, cujos fatores foram as diferentes concentrações de oxigênio com 4 diferentes condições (hipoxia, anoxia, normoxia e meio mínimo).

Para a radiação UV foram utilizados 13 tempos de exposição (0, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 e 210 min), para o KCl serão utilizadas 10 concentrações (0, 0.9, 1.0, 1.3, 1.4, 1.5, 1.7, 1.9, 2.1, 2.4 M) e para o 4NQO serão utilizadas 16 concentrações (0.0, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 μ M). Cada estresse teve 3 repetições.

Para a análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Os resultados foram submetidos a análise de variância, aplicando-se o teste F. O teste Tukey ($p < 0,05$), foi empregado para comparação das médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Requerimentos energéticos e limite para fotoativação utilizando diferentes intensidades de luz branca em *Metarhizium robertsii*

5.1.1 Germinação de conídios em diferentes intensidades de luz branca em *Metarhizium robertsii*

A germinação de conídios produzidos em meio mínimo (MM = Czapek Dox Agar sem sacarose), é mais rápida e com alta taxa de germinação nas primeiras 10 horas em ambos os tratamentos de luz e escuro (Figura 8). Este resultado é semelhante ao estudo anterior para o isolado 2575, onde conídios produzidos em meio CZAPEK germinaram mais rápido do que os conídios produzidos em meio BDA (RANGEL et al., 2004). A velocidade de germinação mais rápida dos conídios produzidos em MM é devido à maior acumulação de trealose e manitol dentro dos conídios (RANGEL et al., 2011; RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008), portanto, a mobilização desses dois carboidratos permite uma germinação mais rápida do que quando os conídios são produzidos em meio BDA, que acumulam muito poucas quantidades de trealose e manitol (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008).

Alguns autores relataram a influência da luz na produção de conídios. Para *Metarhizium acridum*, o regime de iluminação contínua foi o tratamento que apresentou os melhores resultados no crescimento e esporulação (ONOFRE et al., 2001), para *M. anisopliae s.l.* apresentou melhor produção conidial sob luz intermitente durante 16h. Por outro lado, em estudos com *M. robertsii* (ARSEF 2575), a esporulação não é afetada pela luz quando os conídios foram produzidos no BDAY sob luz contínua ou escura, os rendimentos dos conídios foram semelhantes (KEYSER; THORUP-KRISTENSEN; MEYLING, 2014; RANGEL et al., 2011). A própria luz em si pode ser uma fonte de estresse oxidativo para a célula fúngica, como em *Botrytis cinerea*, na qual houve uma redução da taxa de crescimento sob a luz branca (400-720 nm) (CANESSA et al., 2013), bem como foi também observada uma ligeira redução do crescimento micelial por luz em *Aspergillus fumigatus* (FULLER et al., 2013) e *Cordyceps militaris* (YANG; DONG, 2014). Neste estudo, foi observado que em *M. robertsii* (ARSEF 2575), as exposições à luz branca em ambas as câmaras foram um pouco deletérias para a germinação da velocidade entre as 8h e as 10h de exposição, onde

os conídios produzidos em condições escuras germinaram mais rápido do que os conídios produzidos em condições de luz (Figura 8).

Embora a luz tenha afetado a germinação, todos os tratamentos apresentaram 100% de germinação após 14 horas (Figura 8). Indicando que existe um processo de adaptação que faz com que o crescimento não seja afetado pela luz.

Figura 8 - Média da porcentagem de germinação de *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575).

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Os conídios foram crescidos em meio mínimo (MM) ou BDA nas condições: 1) MM no escuro (Panasonic Escuro); 2) MM sob luz branca (Panasonic Luz - 5 lumens); 3) BDA no escuro (Panasonic Escuro); 4) BDA sob luz branca (Panasonic Luz 5 LUMENS); 5) BDA no escuro (Marconi Escuro); 6) BDA sob luz branca (Marconi Luz). A média é de três diferentes repetições realizadas em diferentes dias. Barras de erro representam o erro padrão da média. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

5.1.2 Tolerância de conídios produzidos em diferentes intensidades de luz branca ao estresse osmótico em *Metarhizium robertsii*

No geral, em ambas as câmaras panasonic e marconi, conídios produzidos sob a luz branca apresentaram maior tolerância ao estresse osmótico em comparação com os conídios produzidos no escuro (Figura 9). Este resultado já era esperado para o estresse osmótico, pois está bem estabelecido que a luz branca durante o crescimento micelial induz uma maior tolerância conidiana à radiação UV-B e ao calor em *M. robertsii* (RANGEL et al., 2011).

Neste estudo, não houve grande diferença de tolerância entre as intensidades de luz testadas. Como se pode verificar nas intensidades da incubadora panasonic (1 e 4 lumens), embora os conídios produzidos na câmara Panasonic tenham uma maior tolerância em

comparação com a câmara Marconi em concentração de 1,5 M de KCl, nas demais concentrações os resultados foram semelhantes à tolerância conidial quando produzidos na incubadora Marconi (Figura 9). A Intensidade de luz semelhante na incubadora Marconi e na incubadora de panasonic a 3 lumens e a 5 lumens, produziu resultados semelhantes na tolerância de conídios ao estresse osmótico (Figura 9). Resultado semelhante, foi observado no estudo realizado com *Alternaria alternata*, que demonstrou que a luz não foi necessária para a esporulação, o tamanho, a forma, nem o número de conídios formados pelos diversos regimes de luz (MISAGHI et al., 1978), também foi observado em *Cladosporium* spp, que diferentes regimes de luz, não apresentaram diferença significativa no desenvolvimento do fungo (ABDEL-BAKY et al., 1998).

Sabe-se que esporos de fungos produzidos em meios de cultura pobres se tornam mais tolerantes a vários estresses devido à acumulação do carboidrato trealose e manitol nos esporos ou conídios de fungos protegendo-os contra vários estresses (HALLSWORTH; MAGAN, 1994; RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008). Em *M. robertsii* conídios produzidos sob estresse nutritivo (sem fonte de carbono), indicou um expressivo aumento de tolerância à radiação UV-B do que os conídios produzidos sob condições normais em um meio rico em fonte de carbono (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2006). Resultado similar foi observado em *M. robertsii* nos conídios produzidos sob estresse nutritivo (MM), conídios produzidos sob MM foram mais tolerantes ao estresse osmótico, seguido dos conídios produzidos sob as diferentes intensidades de luz (Figura 9). Apesar do aumento de tolerância, a produção de conídios sob estresse nutritivo (MM) foi extremamente baixa para todos os isolados (Figura 9).

Figura 9 - Média da porcentagem de germinação de *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575).

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Os conídios foram produzidos previamente em: 1) meio mínimo (MM) no escuro, 2) meio BDA no escuro (Panasonic Escuro); 3) meio BDA sob luz branca (Panasonic Luz); 4) meio BDA no escuro (Marconi Escuro); 5) meio BDA sob luz branca (Marconi Luz). Para exposição ao estresse osmótico, os conídios foram inoculados em meios de cultura BDA (controle) ou BDA suplementado com KCl nas concentrações de 1.3, 1.4, 1.5, 1.7 e 1.9 M por 24 horas.

5.2 Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

5.2.1 Influência da luz branca no aumento da tolerância à radiação UV

A radiação UV solar é um dos principais fatores ambientais que podem matar conídios de vários fungos entomopatogênicos (BRAGA et al., 2002). No presente estudo, conídios crescidos expostos a luz constante aumentou significativamente a tolerância a radiação UV nos isolados *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575) e *Isaria fumosorosea* (ARSEF 3889) (Figura 10).

Conídios do isolado *M. robertsii* (ARSEF 2575), crescidos sob a luz branca, apresentaram com 140 minutos de exposição, ser duas vezes mais tolerantes do que conídios crescidos no escuro, esse resultado corrobora com Rangel et al. (2011), onde relatou que o micélio de *M. robertsii* produzido em meio BDAY (meio batata dextrose agar suplementado com extrato de levedura) sob luz branca contínua, apresentou ser duas vezes mais tolerante à radiação UV do que produzido no escuro (Figura 10c).

O fungo *I. fumosorosea* tem sua reprodução assexuada regulada por luz contínua ou intermitente (SÁNCHEZ-MURILLO et al., 2004) não produzindo esporos no escuro (SAKAMOTO; INOUE; AOKI, 1985). Devido ao fato do isolado ser o único que necessita da luz para esporulação, esperava-se que a luz induzisse o aumento de tolerância do fungo *I. fumosorosea* aos diversos estresses. No presente estudo, então, observou-se que a luz influenciou o aumento de tolerância em *I. fumosorosea* (ARSEF 3889), quando exposto à radiação UV, houve um expressivo aumento de tolerância à radiação UV se comparado ao controle, apresentando ser duas vezes mais tolerantes em 140 min de exposição (Figura 10e).

Em fungos o aumento de tolerância a estresse ambiental relaciona-se muitas vezes com a pigmentação presente nos conídios, entretanto, este aumento de tolerância induzido pela luz, não se relaciona com pigmentos, como melanina e carotenóides, visto que os mesmos não são encontrados em conídios dos isolados estudados (exceto *A. aleoformis* que contém carotenóides). Carotenóides são pigmentos antioxidantes com grande capacidade de extinguir espécies reativas de oxigênio e são importantes para proteção da célula contra radiação ultravioleta. (SCHROEDER et al., 1996). Entretanto, verificou-se nessa pesquisa que a pigmentação não influenciou no aumento de tolerância à radiação UV quando os isolados foram mantidos sob luz branca, pois somente *I. fumosorosea* (ARSEF 3889) com

coloração lilás e o *M. robertsii* (ARSEF 2575) que possui coloração verde escura apresentaram aumento de tolerância à radiação (Figura 10c e 10e).

O estresse nutricional causado pelo MM, é conhecido por induzir maior tolerância à radiação UV-B (RANGEL et al., 2011, 2015a; RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2006). Portanto, esse meio foi usado como controle para saber se alguma condição de luz supera a causada pelo MM. Neste estudo, o crescimento micelial sob (MM) significativamente induziu um aumento da tolerância de conídios a radiação UV em seis isolados, *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. brunneum* (ARSEF 1187), *M. robertsii* (ARSEF 2575), *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392), *T. inflatum* (ARSEF 4877), e *M. anisopliae* (ARSEF 5749) (Figura 9). Novamente, apesar do aumento de tolerância, a produção de conídios sob estresse nutritivo (MM) foi extremamente baixa para todos os isolados.

Os isolados *L. aphanocladii* (ARSEF 6433), *S. lanosoniveum* (ARSEF 6651) e *A. aleyrodis* (ARSEF 10276), produzidos no meio mínimo, luz branca e escuro não apresentaram diferenças significativas (Figura 10).

Figura 10 - Média da porcentagem de germinação de conídios tratados com radiação UV de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio BDA no escuro (Escuro); 2) meio BDA sob luz branca (Luz); 3) condições de estresse nutricional em meio mínimo (MM).

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Os conídios foram expostos à radiação UV por 100 a 210 minutos, equivalentes às irradiâncias de 3.5 a 7.5 kJ/m², respectivamente. ☒ Não houve produção de conídios em meio mínimo.

5.2.2 Influência da luz branca no aumento da tolerância ao estresse osmótico

A exposição das células às condições de estresse moderado gera proteção, não só contra o fator que causa o estresse, mas também contra outros fatores de estresse (RANGEL, 2011). A exposição de *M. anisopliae* a 0,1 mM de menadiona (estresse oxidativo) ou a 0,4 M de NaCl (estresse osmótico) conduziu a um efeito de proteção cruzada a uma temperatura de 45 ° C (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008). Neste estudo, foi observado um efeito semelhante nos isolados *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. brunneum* (ARSEF 1187), *M. robertsii* (ARSEF 2575), *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392), *L. aphanocladii* (ARSEF 6433) e *A. aleyrodis* (ARSEF 10276), onde os conídios desses isolados produzidos sob a luz branca, apresentaram resistência ao estresse osmótico se comparado com os conídios produzidos no escuro (Figura 11). Estas resistências aumentadas contribuem para a qualidade geral dos conídios, mesmo antes de um ataque de inseto ser iniciado.

Apesar de seis isolados apresentarem aumento de tolerância ao estresse osmótico quando crescidos sob a luz branca, os mesmos demonstraram diferentes tolerâncias. O isolado que apresentou maior tolerância quando crescido sob a luz branca, foi *M. robertsii* (ARSEF 2575), seguido de *M. brunneum* (ARSEF 1187) e *A. aleyrodis* (ARSEF 10276), apresentando ser três vezes mais tolerante nas concentrações de 1.3 a 1.7 M de KCl do que o isolado crescido no escuro. Os isolados *B. bassiana* (ARSEF 252), *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392) apresentaram ser duas vezes mais tolerante ao estresse osmótico na concentração de 1.0 e 1.3 M de KCl, respectivamente. O isolado *L. aphanocladii* (ARSEF 6433), apresentou um discreto aumento de tolerância ao estresse apenas na concentração de 1.9 M de KCl. Estudos de efeito da luz no aumento de tolerância ao estresse osmótico em com fungos entomopatogênicos são escassos. No estudo realizado com *Tricoderma atroviride*, verificou-se que a luz estimulou a tolerância ao estresse osmótico a 0.2 M de KCl, ao ser comparado com o crescido no escuro (ESQUIVEL-NARANJO et al., 2016).

Conídios de cinco isolados, *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. brunneum* (ARSEF 1187), *M. robertsii* (ARSEF 2575), *I. fumosorosea* (ARSEF 3889), e *M. anisopliae* (ARSEF 5749) produzidos sob estresse nutritivo (MM), foram tolerantes ao estresse osmótico do que conídios produzidos no escuro em meio BDA (Figura 11).

Os isolados de *T. inflatum* (ARSEF 4877) e *S. lanosoniveum* (ARSEF 6651), não apresentaram diferenças significativas, quando produzidos no meio mínimo, luz branca e escuro (Figura 11).

Figura 11 - Média da porcentagem de germinação de conídios tratados com KCl de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio BDA no escuro (Escuro); 2) meio BDA sob luz branca constante (Luz); 3) condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM).

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Os conídios produzidos nas condições acima foram inoculados em meios de cultura BDA contendo concentrações de 0.9 a 2.4 M de KCl. ☒ Não houve produção de conídios em meio mínimo.

5.2.3 Influência da luz branca no aumento da tolerância ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

O crescimento micelial sob luz branca aumentou significativamente a tolerância ao estresse causado pelo agente genotóxico em conídios de 3 isolados *B. bassiana* (ARSEF 252) e *M. brunneum* (ARSEF 1187) e *A. aleyrodis* (ARSEF 10276) (Figura 12).

O isolado que apresentou maior tolerância foi *A. aleyrodis* (ARSEF 10276), apresentando ser três vezes mais tolerante quando crescido sob a luz branca do que o isolado crescido no escuro nas concentrações de 0.7 a 2.0 μM de 4NQO. O segundo isolado foi *M. brunneum* (ARSEF 1187), que apresentou ser duas vezes mais tolerante na concentração 1.0 μM de 4NQO, por último, o isolado *B. bassiana* (ARSEF 252) apresentou discreto aumento e tolerância apenas na concentração 0.7 μM de 4NQO. Este resultado corrobora com Azevedo (2011), verificou que os isolados *M. robertsii*, *M. brunneum* e *M. anisopliae*, crescidos sob luz branca apresentaram ser duas vezes mais tolerantes ao agente oxidativo menadione do que os isolados crescido no escuro.

Devido à presença de carotenóides, esperava-se que o *A. aleyrodis* fosse mais tolerante ao 4NQO do que os outros fungos que não produzem carotenóides. Entretanto, os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* não produzem carotenóide (FANG et al., 2010; GONZALES et al., 2010; ZHAO et al., 2014) ou melanina (FANG et al., 2010; RANGEL et al., 2006) que poderiam proteger conídios contra o estresse oxidativo.

No presente estudo, os isolados *M. robertsii* (ARSEF 2575) e *I. fumosorosea* crescidos sob a luz branca, apresentaram significativo aumento de tolerância à radiação UV, entretanto, não apresentaram aumento de tolerância ao 4NQO, este resultado não foi tão surpreendente, porque investigações recentes em *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram claramente que o 4-NQO, ao contrário da luz UV de 254 nm, gera um grau substancial de estresse oxidativo intracelular, com consequências significativas para células expostas a 4-NQO ao nível de morte celular e mutagênese (RAMOTAR et al., 1998).

O crescimento micelial sob estresse nutricional (MM) induziu moderadamente o aumento da tolerância de conídios ao estresse causado pelo agente genotóxico em conídios de dois isolados, *B. bassiana* (ARSEF 252) e *I. fumosorosea* (ARSEF 3889) (Figura 12).

Os isolados *M. robertsii* (ARSEF 2575), *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392), *T. inflatum* (ARSEF 4877), *M. anisopliae* (ARSEF 5749), *L. aphanocladii* (ARSEF 6433) e *S. lanosoniveum* (ARSEF 6651), não apresentaram diferenças significativas quando produzidos no meio mínimo, luz branca e escuro (Figura 12).

Figura 12 - Média da porcentagem de germinação de conídios tratados com 4NQO de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio BDA no escuro (Escuro); 2) meio BDA sob luz branca constante (Luz); 3) condições de estresse nutricional em meio mínimo (MM).

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Os conídios produzidos nas condições acima foram inoculados em meios de cultura BDA contendo concentrações de 0.5 a 7.0 μM de 4NQO. ☒ Não houve produção de conídios em meio mínimo.

5.3 Influência da luz azul, vermelha e verde no aumento da tolerância à radiação UV e ao estresse osmótico

O crescimento micelial em meio mínimo induziu significativamente o aumento da tolerância à radiação UV em conídios do isolado *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575), seguido do crescimento micelial sob a luz azul e luz branca (Figura 13a).

O crescimento micelial sob a luz azul percival apresentou diferença significativa em 150 e 160 minutos, seguido do crescimento micelial sob a luz verde com diferença significativa em 150 minutos. O crescimento micelial sob a luz vermelha produziu conídios menos tolerantes à radiação UV, onde pode-se observar que a luz vermelha reduziu significativamente a tolerância (Figura 13a). O mesmo resultado foi observado no fungo *Metarhizium acridum*, quando exposto a luz branca ou azul, apresentou aumento de tolerância à radiação UV-B. A luz vermelha, no entanto, não teve o mesmo efeito (BRANCINI; RANGEL; BRAGA, 2016). Em *Aspergillus fumigatus*, por exemplo, a exposição de fungos crescidos à luz azul leva à resistência à radiação UV, em relação às amostras mantidas no escuro antes da exposição (FULLER et al., 2013). A capacidade da luz para promover a resistência UV também foi mostrada em *Cryptococcus neoformans* (VERMA; IDNURM, 2013).

O crescimento micelial em meio mínimo induziu significativamente o aumento da tolerância ao estresse osmótico em conídios do isolado *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575).

O crescimento micelial sob a luz branca, luz azul e luz azul percival, induziu aumento significativo da tolerância ao estresse osmótico, se comparado com o controle crescido no escuro, conforme pode ser observado nas concentrações 1.3 e 1.4 M de KCl, entretanto, não teve diferença significativas entre eles. O crescimento micelial sob a luz vermelha apresentou ser menos tolerante ao estresse osmótico, demonstrando que a luz vermelha afeta significativamente a tolerância (Figura 13b).

Figura 13 - Média da porcentagem de germinação de conídios expostos a radiação UV em *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575), produzido em: 1) meio (BDA) crescido no escuro (controle); 2) em meio BDA crescido sob (A) luz branca (irradiância 4.98 W m⁻²); (B) luz azul (irradiância 4.8 W m⁻²); (C) luz azul (irradiância 9.7 W m⁻²); (C) luz verde (irradiância 2.2 W m⁻²); (D) luz vermelha (irradiância 2.8 W m⁻²) and 3) sob nutricional estresse (MM) no escuro.

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: (a) Os conídios foram expostos à radiação UV por 100 a 210 minutos, equivalentes às irradiâncias de 3.5 a 7.5 kJ/m², respectivamente. (b) Os conídios produzidos nas condições acima foram inoculados em meios de cultura BDA contendo concentrações de 1.0 a 2.1 M de KCl. As barras de erro são os erros padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em tempos diferentes.

5.4 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV, estresse osmótico e ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

5.4.1 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância à radiação UV

Nossos resultados mostram que a aplicação de atmosferas modificadas, contendo baixas concentrações de oxigênio, melhora a tolerância dos conídios produzidos de quatro isolados. Isso pode estar relacionado a uma alteração nos níveis de ROS e à resposta ao estresse oxidativo (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

A condição de hipóxia induziu o aumento da tolerância de conídios ao estresse causado pela radiação UV em quatro isolados *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. brunneum* (ARSEF 1187), *M. robertsii* (ARSEF 2575), e *M. anisopliae* (ARSEF 5749) (Figura 14). O crescimento micelial sob estresse anóxico induziu maior tolerância em conídios ao estresse causado pela radiação UV em dois isolados *B. bassiana* (ARSEF 252), e *M. robertsii* (ARSEF 2575) (Figura 14).

A adaptação de microorganismos sob o estresse oxidativo gerado por peróxido de hidrogênio, radiação UV-A, ou outros oxidantes induz a proteção cruzada para outras condições de estresse, radiação UV (VERMA; SINGH, 2001), calor e peróxido de hidrogênio (HARTKE et al., 1995). No entanto, peróxido de hidrogênio ou radiação UV-A, não induziram a proteção cruzada contra a radiação UV e calor para *M. anisopliae* (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008). Neste estudo, é interessante observar que todos os isolados do gênero *Metarhizium*, apresentaram significativo aumento de tolerância. O isolado que apresentou a maior tolerância foi *M. robertsii* (ARSEF 2575), que em 150 min de exposição a radiação UV, apresentou cerca de 90% de germinação quando crescido sob hipóxia e 50% de germinação quando crescido sob anoxia, ao passo que o controle crescido sob normoxia, apresentou apenas 5% de germinação.

O crescimento micelial sob estresse nutricional (MM) induziu o aumento da tolerância de conídios ao estresse causado pela radiação UV em seis isolados *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. brunneum* (ARSEF 1187), *M. robertsii* (ARSEF 2575), *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392), *T. inflatum* (ARSEF 4877) e *M. anisopliae* (ARSEF 5749) (Figura 14).

Os isolados *I. fumosorosea* (ARSEF 3889), *L. aphanocladii* (ARSEF 6433), *S. lanosoniveum* (ARSEF 6651) e *A. aleyrodii* (ARSEF 10276), produzidos no meio mínimo, anoxia e hipoxia não apresentaram diferenças significativas (Figura 14).

Figura 14 - Média da porcentagem de germinação de conídios de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio de cultura de batata dextrose agar (BDA) em condições normóxicas por 14 dias (Controle); 2) meio BDA em condições de hipoxia (placas seladas com Parafilm) por 14 dias (Selada); 3) em condições de anaerobiose a partir do segundo dia de crescimento por cinco dias, e transferidas em condições normóxicas por sete dias (Anaerobiose); e 4) em condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM).

Continua.

Conclusão

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Os conídios foram expostos à radiação UV por 100 a 210 minutos, equivalentes às irradiâncias de 3.5 a 7.5 kJ/m², respectivamente. ☒ Não houve produção de conídios em anaerobiose ou meio mínimo.

5.4.2 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância ao estresse osmótico

Nossos resultados mostram que a aplicação de atmosferas modificadas, contendo baixas concentrações de oxigênio, melhora a tolerância ao estresse osmótico dos conídios produzidos em seis isolados. As condições de hipóxia induziram nos isolados *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. brunneum* (ARSEF 1187), *M. robertsii* (ARSEF 2575), *T. inflatum* (ARSEF 4877), *M. anisopliae* (ARSEF 5749) e *A. aleyrodis* (ARSEF 10276), a tolerância ao estresse osmótico (Figura 14). As condições de anoxia induziram os isolados *M. brunneum* (ARSEF 1187), *M. robertsii* (ARSEF 2575), *T. inflatum* (ARSEF 4877) e *M. anisopliae* (ARSEF 5749), a tolerância ao estresse osmótico (Figura 15).

Novamente, *B. bassiana* (ARSEF 252) e todos os isolados do gênero *Metarhizium*, apresentaram significativo aumento de tolerância. O isolado que apresentou a maior tolerância foi *M. robertsii* (ARSEF 2575), em 1.4 M de KCl, apresentou cerca de 90% de germinação quando crescido sob hipóxia e 50% de germinação quando crescido sob anoxia, ao passo que o controle crescido sob normoxia, apresentou apenas 20% de germinação (Figura 15).

É interessante também observar que os isolados *T. inflatum* (ARSEF 4877) e *A. aleyrodis* (ARSEF 10276), crescido sob hipóxia e anoxia, apresentaram significativa tolerância ao estresse osmótico se comparado com o controle e com o MM, como pode ser observado em 1.7 M e 1.0 M de KCl, respectivamente (Figura 15).

Os isolados *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. brunneum* (ARSEF 1187), *M. robertsii* (ARSEF 2575), *I. fumosorosea* (ARSEF 3889), *M. anisopliae* (ARSEF 5749) e *S. lanosoniveum* (ARSEF 6651), produzidos sob estresse nutritivo (MM), foram mais tolerantes ao estresse osmótico do que o controle (Figura 15).

Os isolados *L. aphanocladii* (ARSEF 6433), *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392), produzidos no meio mínimo, anoxia e hipoxia não apresentaram diferenças significativas (Figura 15).

Os isolados *I. fumosorosea* (ARSEF 3889), *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392), e *S. lanosoniveum* (ARSEF 6651) perdem a viabilidade ao serem transferidos para jarra de anaerobiose (Figura 15).

Figura 15 - Média da porcentagem de germinação de conídios de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio de cultura de batata dextrose agar (BDA) em condições normóxicas por 14 dias (Controle); 2) meio BDA em condições de hipoxia (placas seladas com Parafilm) por 14 dias (Selada); 3) em condições de anaerobiose a partir do segundo dia de crescimento por cinco dias, e transferidas em condições normóxicas por sete dias (Anaerobiose); e 4) em condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM).

Continua.

Conclusão.

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Os conídios produzidos nas condições acima foram inoculados em meios de cultura contendo concentrações de 0.9 a 2.4 M de KCl. ☒ Não houve produção de conídios em anaerobiose ou meio mínimo.

5.4.3 Influência de Hipoxia e Anoxia no aumento da tolerância ao agente genotóxico 4-nitroquinolina-1-óxido

As condições de hipóxia, induziram o aumento da tolerância de conídios ao agente genotóxico nos isolados *B. bassiana* (ARSEF 252) e *M. brunneum* (ARSEF 1187), e *A. aleyrodis* (ARSEF 10276) (Figura 15). As condições de anóxia induziram o aumento da tolerância de conídios ao agente genotóxico nos isolados *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. anisopliae* (ARSEF 5749), e *A. aleyrodis* (ARSEF 10276) (Figura 16).

Novamente, os isolados *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. brunneum* (ARSEF 1187) e *M. anisopliae* (ARSEF 5749), apresentaram alta tolerância ao estresse genotóxico, entretanto, O isolado que apresentou maior tolerância foi *A. aleyrodis* (ARSEF 10276), apresentando ser três vezes mais tolerante do que o isolado crescido na normoxia nas concentrações de 0.7 a 2.0 μM de 4NQO. Conforme já foi mencionado, entre os fungos usados em nosso estudo, *A. aleyrodis* é a única espécie que produz pigmento carotenóide. Este resultado corrobora com estudos de Souza (2011), que verificaram que conídios dos isolados *A. aleyrodis* (ARSEF 10276), *B. bassiana* (ARSEF 252), *M. brunneum* (ARSEF 1187) e *M. anisopliae* (ARSEF 5749), produzidos sob hipoxia e anoxia, apresentaram alta tolerância ao estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 e menadiona.

O crescimento micelial sob estresse nutricional (MM) induziu o aumento da tolerância de conídios ao estresse ao agente genotóxico nos isolados *Beauveria bassiana* (ARSEF 252) (Figura 16).

Os isolados *M. robertsii* (ARSEF 2575), *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392), *I. fumosorosea* (ARSEF 3889), *T. inflatum* (ARSEF 4877), *L. aphanocladii* (ARSEF 6433) e *S. lanosoniveum* (ARSEF 6651), produzidos no meio mínimo, anoxia e hipoxia não apresentaram diferenças significativas (Figura 16).

Os isolados *I. fumosorosea* (ARSEF 3889), *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392), e *S. lanosoniveum* (ARSEF 6651) perdem a viabilidade ao serem transferidos para jarra de anaerobiose (Figura 16).

Figura 16 - Média da porcentagem de germinação de conídios de dez espécies de fungos entomopatogênicos produzidos em: 1) meio de cultura de batata dextrose agar (BDA) em condições normóxicas por 14 dias (Controle); 2) meio BDA em condições de hipoxia (placas seladas com Parafilm) por 14 dias (Selada); 3) em condições de anaerobiose a partir do segundo dia de crescimento por cinco dias, e transferidas em condições normóxicas por sete dias (Anaerobiose); e 4) em condições de estresse nutritivo em meio mínimo (MM)

Continua.

Conclusão.

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Os conídios produzidos nas condições acima foram inoculados em meios de cultura contendo concentrações de 0.5 a 4.0 μM de 4NQO. ☒ Não houve produção de conídios em anaerobiose ou meio mínimo.

5.5 Correlação entre a tolerância de conídios produzidos sob luz visível, anoxia e hipoxia aos diferentes estresses

Conídios do fungo *B. bassiana* (ARSEF 252), crescidos sob luz visível apresentaram um aumento de tolerância ao KCl e ao 4NQO. Enquanto que conídios sob hipoxia e estresse nutritivo (MM) apresentaram um aumento de tolerância à radiação UV, KCl e ao 4NQO. Conídios sob anoxia, apresentaram um aumento de tolerância à radiação UV e ao 4NQO (Tabela 4).

Conídios do fungo *M. brunneum* (ARSEF 1187) crescidos sob luz visível apresentaram aumento de tolerância ao KCl e ao 4NQO. Enquanto que conídios sob hipoxia apresentaram aumento de tolerância à radiação UV, KCl e ao 4NQO, conídios sob estresse nutritivo (MM) apresentaram aumento de tolerância à radiação UV e ao KCl. Conídios sob anoxia apresentaram aumento de tolerância apenas ao KCl (Tabela 4).

Conídios do fungo *M. robertsii* (ARSEF 2575) crescidos sob luz visível, hipoxia, anoxia e sob estresse nutritivo (MM) apresentaram aumento de tolerância à radiação UV e ao KCl (Tabela 4).

Conídios do fungo *T. cylindrosporum* (ARSEF 3392) crescidos sob luz visível apresentaram aumento de tolerância apenas ao KCl. Enquanto que conídios crescidos estresse nutritivo (MM) apresentaram aumento de tolerância apenas à radiação UV (Tabela 8).

Conídios do fungo *I. fumosorosea* (ARSEF 3889) crescidos sob luz visível apresentaram aumento de tolerância apenas à radiação UV. Enquanto que conídios crescidos sob estresse nutritivo (MM) apresentaram aumento de tolerância ao KCl e ao 4NQO. Não houve produção de conídios sob anoxia (Tabela 4).

Conídios do fungo *T. inflatum* (ARSEF 4877), crescidos sob luz visível não apresentaram diferença de tolerância aos diversos tipos de estresse. Entretanto, quando crescidos sob hipoxia e anoxia apresentaram aumento de tolerância ao KCl apenas. Já quando os conídios foram crescidos sob estresse nutritivo (MM), apresentaram aumento apenas à radiação UV (Tabela 4).

Conídios do fungo *M. anisopliae* (ARSEF 5749) crescidos sob luz visível não apresentaram diferença de tolerância aos diversos tipos de estresse. Entretanto, conídios crescidos sob hipoxia e sob estresse nutritivo (MM) apresentaram aumento de tolerância à radiação UV e ao KCl. Enquanto que conídios crescidos sob anoxia apresentaram aumento de tolerância ao KCl e 4NQO (Tabela 4).

Conídios do fungo *L. aphanocladii* (ARSEF 6433) crescidos sob luz visível apresentaram aumento de tolerância apenas à radiação ao KCl. Não houve produção de conídios sob anoxia (Tabela 4).

Conídios do fungo *S. lanosoniveum* (ARSEF 6651) crescidos apenas sob estresse nutritivo (MM) apresentaram aumento de tolerância ao KCl. Não houve produção de conídios sob anoxia (Tabela 4).

Conídios do fungo *A. aleyrodis* (ARSEF 10276) produzidos sob luz visível apresentaram aumento de tolerância ao KCl e ao 4NQO. Enquanto que conídios crescidos sob anoxia apresentaram aumento de tolerância apenas ao 4NQO. Entretanto, conídios produzidos sob hipoxia apresentaram aumento de tolerância KCl e ao 4NQO. Não houve produção de conídios sob estresse nutritivo (MM) (Tabela 4).

Tabela 4 - Correlação entre as tolerâncias de conídios em diferentes estresses

Espécies	Produção conidial sob luz visível			Produção conidial sob hipoxia			Produção conidial sob anoxia			Produção conidial sob MM		
	UV	KCl	4NQO	UV	KCl	4NQO	UV	KCl	4NQO	UV	KCl	4NQO
<i>Beauveria bassiana</i>	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Metarhizium brunneum</i>	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não
<i>Metarhizium robertsii</i>	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
<i>Isaria fumosorosea</i>	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	*	*	*	Não	Sim	Sim
<i>Tolypocladium inflatum</i>	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	*	*	*	Não	Não	Não
<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	*	*	*	Não	Não	Não
<i>Aschersonia aleyrodis</i>	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	**	**	**

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Sim, induziu a resposta ao aumento de tolerância. Não, não induziu a resposta ao aumento de tolerância.

*Não houve produção de conídios sob anoxia. **Não houve produção de conídios sob estresse nutritivo (MM)

5.6 Análises de expressão gênica

As HSPs são uma classe de proteínas que conferem auto-proteção em condições de estresse geral, que apresentam sequências conservadas ao longo do tempo. Essas proteínas funcionam como chaperonas moleculares, que ajudam a proteger da desnaturação de proteínas irreversíveis (KARUNANITHI; BROWN, 2015). Neste estudo, selecionamos um membro dos bem conhecidos pequenos HSPs (Mrhsp30), mas também um gene pertencente aos HSPs menos estudados (Mrhsp101). Ao comparar as expressões gênicas nas diferentes condições de cultivo, observou-se que o gene hsp30 foi induzido em todas as condições, exceto pela condição de hipoxia, que apresentou a indução do gene hsp101. Embora o gene hsp30 tenha sido expresso, houve uma grande variação de expressão nos diferentes cultivos (tabela 5). Portanto, ambos os genes foram altamente regulados sob diferentes condições de luz branca e condições de oxigênio, sugerindo um papel ativo de HSPs em exposição fúngica aos diferentes componentes do espectro visível e oxigenação. Esses resultados confirmam a ampla atividade dessas proteínas para mitigar condições estressantes muito diferentes e não relacionadas; vários genes de hsp foram induzidos por temperaturas extremas, a presença de agentes oxidativos ou osmóticos (WANG et al., 2014) e durante a interação com o inseto hospedeiro (LOVETT; ST. LEGER, 2015).

Ambos as superóxido dismutases como as catalases desempenham um papel importante na defesa celular de primeira linha contra espécies reativas de oxigênio (ROS). Não há relatos sobre a caracterização funcional de genes de superóxido dismutase em *M. robertsii*. Depois de pesquisar no genoma de *M. robertsii*, selecionamos para a expressão estudos os genes ortólogos que codificam para dois SODs citosólicos; ou seja, os genes (Mrsod1) e (Mrsod2). Ambos foram diferencialmente expressos sob as condições de crescimento e luz testadas, Mrsod1 não foi regulado, mas Mrsod2 foi regulado em fungos cultivados em meio mínimo e conídios que ficaram expostos à luz vermelha. Embora não haja informações sobre esses genes em fungos entomopatogênicos expostos à luz e condições de oxigênio, *B. bassiana* utiliza ambos os genes para eliminar com sucesso o ROS gerado pela radiação UV-A e UV-B; no entanto, Bbsod2 contribui muito mais do que Bbsod1 para a atividade SOD total em fungos a estresse UV (XIAO et al., 2012). A fotorreativação é um mecanismo de reparo direto onde a enzima, denominada fotoliase, reverte diretamente as lesões do DNA induzidas por luz UV, protegendo o genoma dos efeitos deletérios da radiação (FARAJI; DREUW, 2014). Neste estudo, o Mr6-4phr foi induzido sob exposição à luz branca, azul e verde, da mesma forma que no meio mínimo,

mas o MrCPDphr não foi regulado, sugerindo que Mr6-4phr está mais comprometido do que o MrCPDphr na reparação do DNA de *M. robertsii*.

Estudos demonstram que o gene de Mrpr1 é regulado de forma ascendente em meio mínimo, isolados ou adicionados com cutícula de insetos ou caseína (FREIMOSER et al., 2003), em coincidência com o nosso resultado em meio mínimo. O nível de transcrição de Mrpr1 também foi mais abundante do que os controles em fungos expostos à luz verde. As hidrofobinas são proteínas localizadas na superfície dos conídios que fornecem um padrão hidrofóbico superficial, facilitando a ligação passiva a superfícies hidrofóbicas, como a epicúcula do inseto. O promotor hssgA de *M. robertsii* compartilha elementos reguladores a montante com o promotor Mrpr1, sugerindo um padrão de expressão semelhante (BIDOCHKA; KONING; LEGER, 2001). No entanto, encontramos diferentes níveis de expressão para ambos os genes. Diferentes vias de sinalização podem ser ativadas por diferentes condições de estresse de forma complexa, é necessária uma caracterização funcional adicional de todos esses genes e seus promotores, a fim de desenhar um cenário mais completo sobre seu papel para mitigar condições estressante.

Tabela 5 - Expressão média de genes superexpressos em *M. robertsii* (ARSEF 2575) cultivados em: meio mínimo, luz branca, luz azul, luz verde, luz vermelha, luz verde, hipóxia e anoxia, comparando-se com o controle cultivado em meio BDA no escuro.

	Gene	Fold induction	P
Meio mínimo	Mr6-4 phr	106.6	0.000
	Mrhsp30	213.8	0.000
	Mrsod2	3.34	0.000
Luz branca	Mr6-4 phr	31.0	0.000
	Mrhsp30	5.6	0.000
Luz azul	Mr6-4 phr	174.4	0.000
	Mrtps	13.2	0.000
	Mrhsp30	12.5	0.000
Luz vermelha	Mrtps	36.6	0.000
	Mthsp30	61.5	0.000
	Mrhsp101	54.4	0.000
	Mrsod2	1.83	0.000
Luz verde	Mrtps	15.2	0.000
	Mrhsp30	20.0	0.000
	Mrhsp101	47.8	0.000
	Mrpr1	19.3	0.036
Hipoxia	Mrtps	10.3	0.000
	MrHsp101	14.0	0.000
Anoxia	Mrhsp30	9.1	0.0033

Fonte: Arquivo pessoal.

6 CONCLUSÃO

- a) A luz branca induziu o aumento de tolerância aos estresses em *B. bassiana* (KCl e 4NQO), *M. brunneum* (KCl e 4NQO), *M. robertsii* (UV e KCl), *T. cylindrosporum* (KCl), *I. fumosorosea* (UV), *L. aphanocladii* (KCl) e *A. aleyrodis* (KCl e 4NQO);
- b) A hipoxia induziu o aumento de tolerância aos estresses em *B. bassiana* (UV, KCl e 4NQO), *M. brunneum* (UV, KCl e 4NQO), *M. robertsii* (UV, KCl), *M. anisopliae* (UV e KCl), *T. inflatum* (KCl) e *A. aleyrodis* (KCl e 4NQO);
- c) A anoxia induziu o aumento de tolerância ao estresse em *B. bassiana* (UV e 4NQO), *M. brunneum* (KCl), *M. anisopliae* (KCl e 4NQO), *M. robertsii* (UV e KCl), *T. inflatum* (KCl), *A. aleyrodis* (4NQO);
- d) Na influência da luz azul, vermelha e verde no aumento da tolerância à radiação UV e ao estresse osmótico em *M. robertsii*, observou-se o aumento de tolerância em conídios produzidos sob MM, seguido de conídios produzidos sob luz azul e luz branca. O crescimento micelial sob luz vermelha apresentou ser menos tolerante em ambos os tratamentos, afetando de forma significativa a germinação;
- e) Na análise de expressão gênica, os genes superexpressos foram: Mrhsp30 (MM, luz branca, luz, vermelha, luz verde, anoxia), Mrhsp101 (luz vermelha, a luz verde e hipoxia), Mr6-4 phr (MM, luz branca, luz azul), Mrsod2 (MM, luz vermelha), Mrtps (luz azul, vermelha, verde e hipóxia), Mrpr1 (luz verde);
- f) De maneira geral, este estudo mostrou que a manipulação da luz bem como de diferentes condições de oxigênio durante o crescimento micelial em dez isolados de fungos entomopatogênicos, apresentaram efeitos positivos no aumento de tolerância aos estresses testados. Foi observado que não há respostas homogêneas para fungos entomopatogênicos expostos a condições semelhantes de estresse, sugerindo que existem diferentes respostas, portanto, a observação dessas diferentes respostas, podem ser decisivos na escolha desses novos esquemas na produção de fungos entomopatogênicos para o controle biológico.
- g) Dentre os isolados testados, observou-se que *M. robertsii* e *B. Bassiana*, apresentaram maior frequência de aumento de tolerância nos diferentes tratamentos, esse resultado é interessante, pois ambos são altamente utilizados na agricultura para o controle biológico de insetos, portanto, a possibilidade de conseguir o aumento de tolerância aos fatores bióticos e abióticos é altamente promissor, visto que beneficiará muitos agricultores.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BAKY, N. F. et al. Three *Cladosporium* spp. As Promising Biological Control Candidates for Controlling Whiteflies (*Bemisia* spp.) In Egypt. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 3, p. 188–195, 1 mar. 1998.
- ALSTON, D. G. et al. Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Biological Control**, v. 35, n. 2, p. 163–171, nov. 2005.
- ALVES, S. B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 27, n. 1, p. 77–86, 1992.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: _____ (Ed.). . **Controle Microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289–381.
- ALVES, S. B. et al. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In:
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Eds.). . **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 215–237.
- AZEVEDO, R. F. F. **Luz visível durante o crescimento micelial de fungos entomopatogênicos aumenta tolerância dos conídios ao estresse térmico e ao agente oxidativo menadione**. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade do vale do Paraíba, São José dos Campos, 2013.
- AZEVEDO, R. F. F. et al. Responsiveness of entomopathogenic fungi to menadione-induced oxidative stress. **Fungal Biology**, v. 118, n. 12, p. 990–995, dez. 2014.
- BARROS, B. H. R. et al. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **Fungal Biology**, v. 114, n. 7, p. 572–579, jul. 2010.
- BATEMAN, R. P. et al. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of Applied Biology**, v. 122, n. 1, p. 145–152, fev. 1993.
- BAYRAM, O. et al. VelB/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1504–1506, 13 jun. 2008.
- BIDOCHKA, M. J.; KONING, J. D. E.; LEGER, R. J. S. T. Analysis of a genomic clone of hydrophobin (ssg A) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. v. 105, n. March, p. 360–364, 2001.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 64–76, fev. 2000.

- BRAGA, G. U. L. et al. Both Solar UVA and UVB Radiation Impair Conidial Culturability and Delay Germination in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 734–739, 2001b.
- BRAGA, G. U. L. et al. Damage and Recovery from UV-B Exposure in Conidia of the Entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, v. 94, n. 6, p. 912, nov. 2002.
- BRAGA, G. U. L. et al. Effects of UVB Irradiance on Conidia and Germinants of the Entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A Study of Reciprocity and Recovery¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 2, p. 140, 2001a.
- BRAGA, G. U. L. et al. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 105, n. July, p. 874–882, 2001c.
- BRAGA, G. U. L. et al. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 405–425, 1 ago. 2015.
- BRAGA, G. U. L. et al. Variability in Response to UV-B among Species and Strains of *Metarhizium* Isolated from Sites at Latitudes from 61 ° N to 54 ° S. v. 108, n. 2001, p. 98–108, 2011.
- BRANCINI, G. T. P.; RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. Ú. L. Exposure of *Metarhizium acridum* mycelium to light induces tolerance to UV-B radiation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 6, p. fnw036, mar. 2016.
- BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 1115–1136, 1998.
- CALDWELL, M. M. et al. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 2, n. 1, p. 29–38, 2003.
- CALDWELL, M. M.; FLINT, S. D. Uses of biological spectral weighting functions and the need of scaling for the ozone reduction problem. **Plant Ecology**, v. 128, p. 67–76, 1997.
- CAMILO, C. M.; GOMES, S. L. Transcriptional response to hypoxia in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 6, p. 915–925, 2010.
- CANESSA, P. et al. Assessing the Effects of Light on Differentiation and Virulence of the Plant Pathogen *Botrytis cinerea*: Characterization of the White Collar Complex. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 84223, 31 dez. 2013.
- COOK, R. J. et al. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: A framework for scientific evaluation. **Biological Control**, v. 7, n. 3, p. 333–351, 1996.
- CORROCHANO, L. M. Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v.

6, n. 7, p. 725–736, 2007.

DE LIMA ALVES, F. et al. Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 457–477, 9 ago. 2015.

DE MENEZES, H. D. et al. Growth under visible light increases conidia and mucilage production and tolerance to UV-B radiation in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 2, p. 397–402, 2015.

DOWNES, D. J. et al. Characterization of the Mutagenic Spectrum of 4-Nitroquinoline 1-Oxide (4-NQO) in *Aspergillus nidulans* by Whole Genome Sequencing. **G3 & Genes|Genomes|Genetics**, v. 4, n. 12, p. 2483–2492, dez. 2014.

DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 579–587, dez. 2006.
EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology. n. 1, p. 387–400, 2001.

EKESI, S.; MANIANIA, N. .; LUX, S. . Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, n. 2, p. 157–167, jun. 2003.

ERNST, J. F.; TIELKER, D. Responses to hypoxia in fungal pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 183–190, 2009.

ESQUIVEL-NARANJO, E. U. et al. A *Trichoderma atroviride* stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals. v. 100, n. April, p. 860–876, 2016.

ESSEN, L. O. Photolyases and cryptochromes: Common mechanisms of DNA repair and light-driven signaling? **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, n. 1, p. 51–59, 2006.

FANG, W. et al. A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation , tolerance to abiotic stresses and virulence. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 7, p. 602–607, 2010.

FANG, W.; ST. LEGER, R. J. Enhanced UV Resistance and Improved Killing of Malaria Mosquitoes by Photolyase Transgenic Entomopathogenic Fungi. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43069, 17 ago. 2012.

FARAJI, S.; DREUW, A. Physicochemical mechanism of light-driven DNA repair by (6-4) photolyases. **Annual review of physical chemistry**, v. 65, p. 275–292, 2014.

FARIA, M. R. DE; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237–256, dez. 2007.

FAYZALLA, E.-S. A.; SHABANA, Y. M.; MAHMOUD, N. S. Effect of Environmental Conditions on Wilting and Root Rot Fungi Pathogenic to Solanaceous Plants. **Plant Pathology Journal**, v. 7, n. 1, p. 27–33, 1 jan. 2008.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, dez. 2011.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 9 nov. 2000.
- FISCHER, R. DEVELOPMENTAL BIOLOGY: Sex and Poison in the Dark. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1430–1431, 13 jun. 2008.
- FLINT, S. D.; CALDWELL, M. M. A biological spectral weighting function for ozone depletion research with higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 117, p. 137–144, 2003.
- FREIMOSER, F. M. et al. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. p. 239–247, 2003.
- FREIMOSER, F. M. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. **Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 361–371, 1 fev. 2005.
- FRIEDBERG E. C., WALKER G. C., SEIDE W. DNA Repair and Mutagenesis. In: _____ **DNA Repair and Mutagenesis**. 2. ed. Washington, D.C: ASM Press, cap. 8 1995. p. 638.
- FULLER, K. K. et al. The Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Regulates Growth, Metabolism, and Stress Resistance in Response to Light. **mBio**, v. 4, n. 2, p. 00142-13-00142-13, 26 mar. 2013.
- GONZALES, F. P. et al. Photodynamic Inactivation of Conidia of the Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with Methylene Blue and Toluidine Blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 3, p. 653–661, 22 jan. 2010.
- GRAHL, N. et al. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 383–399, abr. 2012.
- HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 8–11, jan. 1994.
- HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. p. 1109–1115, 1995.
- HARTKE, A. et al. UV-inducible proteins and UV-induced cross-protection against acid, ethanol, H₂O₂ or heat treatments in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Archives of Microbiology**, v. 163, n. 5, p. 329–336, 1995.
- HEINTZEN, C. Plant and fungal photopigments. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling**, v. 1, n. 4, p. 411–432, jul. 2012.

HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A. MicroReview Looking through the eyes of fungi : molecular genetics of photoreception. v. 64, p. 5–15, 2007.

HOHL, T. M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: Principles of Pathogenesis and Host Defense. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 11, p. 1953–1963, 1 nov. 2007.

HOHMANN, S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. v. 66, n. 2, p. 300–372, 2002.

HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. v. 98, n. 2008, p. 262–266, 2011.

HUMBER, R. A. a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. v. 120, p. 477–492, 2012.

HUNT, V. L.; CHARNLEY, A. K. The inhibitory effect of the fungal toxin , destruxin A , on behavioural fever in the desert locust. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 10, p. 1341–1346, 2011.

KARUNANITHI, S.; BROWN, I. R. Heat shock response and homeostatic plasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. 68, p. 1–7, 12 mar. 2015.

KEYSER, C. A.; THORUP-KRISTENSEN, K.; MEYLING, N. V. *Metarhizium* seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects. **Fungal Ecology**, v. 11, p. 122–131, 2014.

KOGEJ, T. et al. Mycosporines in extremophilic fungi - Novel complementary osmolytes? **Environmental Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 105–110, 2006.

KWAST, K. E.; BURKE, P. V.; POYTON, R. O. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. **The Journal of experimental biology**, v. 201, n. Pt 8, p. 1177–1195, 1998.

LEGER, R. J. S. T. et al. Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae* , *M. flavoviride* , and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. **Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 907–912, 1996.

LI, Z. et al. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 117–136, 2010.

LIU, S.; PENG, G.; XIA, Y. The adenylate cyclase gene MaAC is required for virulence and multi-stress tolerance of *Metarhizium acridum*. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 163, 2012.

LOSI, A. Flavin-based Blue-light Photosensors: A Photobiophysics Update. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n. 6, p. 1283–1300, nov. 2007.

LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 253–261, 20 ago. 2015.

- LUQUE, E. M. et al. A Relationship between Carotenoid Accumulation and the Distribution of Species of the Fungus *Neurospora* in Spain. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33658, 20 mar. 2012.
- MASUO, S. et al. Global gene expression analysis of *Aspergillus nidulans* reveals metabolic shift and transcription suppression under hypoxia. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 284, n. 6, p. 415–424, 28 dez. 2010.
- MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. **Mycological Research**, v. 110, n. 2, p. 188–195, 2006.
- MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, n. 2, p. 145–155, 2007.
- MILNER, R. J.; HUPPATZ, R. J.; SWARIS, S. C. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, n. 1, p. 121–123, 1991.
- MIRANDA-HERNÁNDEZ, F. et al. Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. **Pest Management Science**, v. 70, n. 4, p. 661–666, 2014.
- MISAGHI, I. J. et al. Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v. 68, p. 29–34, 1978.
- MONTIEL-GONZÁLEZ, A. M. et al. Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2085–2090, 2004.
- NAIR, P. P. et al. The induction of SOS function in *Escherichia coli* K-12/PQ37 by 4-nitroquinoline oxide (4-NQO) and fecapentaenes-12 and -14 is bile salt sensitive: Implications for colon carcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 447, n. 2, p. 179–185, fev. 2000.
- NUNOSHIBA, T.; DEMPLE, B. Potent Intracellular Oxidative Stress Exerted by the Carcinogen 4-Nitroquinoline-1V-oxide. **Cancer Research**, v. 53, n. 14, p. 3250–3252, 1993.
- ONOFRE, S. B. et al. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *Flavoviride* on culture media and lighting regimes. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 3, p. 613–616, set. 2001.
- PARNELL, M.; BURT, P. A.; WILSON, K. The influence of exposure to ultraviolet radiation in simulated sunlight on ascospores causing Black Sigatoka disease of banana and plantain. **International Journal of Biometeorology**, v. 42, p. 22–27, 1998.
- PARRA, J. Biological control in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 71, n. October, p. 345–355,

2014.

PAUL, N. D. et al. The role of interactions between trophic levels in determining the effects of UV-B on terrestrial ecosystems. **Plant Ecology**, v. 128, n. 1–2, p. 296–308, 1997.

PEDIGO, L. P. **Entomology and pest management**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

PFAFFL, M. W. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 36e–36, 1 maio 2002.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, out. 2017.

PURSCHWITZ, J. et al. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 566–571, dez. 2006.

QUAITE, F. E.; SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature**, v. 358, p. 576–578, 1992.

RAMOTAR, D. et al. A Yeast Homologue of the Human Phosphotyrosyl Phosphatase Activator PTPA Is Implicated in Protection against Oxidative DNA Damage Induced by the Model Carcinogen 4-Nitroquinoline 1-Oxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 34, p. 21489–21496, 21 ago. 1998.

RANGEL, D. E. N. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1281–1296, 16 jun. 2011.

RANGEL, D. E. N.; ALSTON, D. G.; ROBERTS, D. W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research**, v. 112, n. 11, p. 1355–1361, 2008.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, v. 112, n. 11, p. 1362–1372, nov. 2008.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, n. 2, p. 127–134, out. 2006.

RANGEL, D. E. N. et al. Culture of *Metarhizium robertsii* on salicylic-acid supplemented medium induces increased conidial thermotolerance. **Fungal Biology**, v. 116, n. 3, p. 438–442, mar. 2012.

RANGEL, D. E. N. et al. Fungal stress biology: a preface to the Fungal Stress Responses special edition. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 231–238, 27 ago. 2015b.

RANGEL, D. E. N. et al. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, n. 3, p. 170–182, nov. 2006.

RANGEL, D. E. N. et al. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 383–404, 2015a.

RANGEL, D. E. N. et al. Thermotolerance of germlings and mycelium of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium* spp. and mycelial recovery after heat stress. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 344–350, 28 jun. 2010.

RANGEL, D. E. N. et al. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 2–3, p. 77–83, out. 2004.

RANGEL, D. E. N. et al. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, n. 2, p. 116–125, fev. 2005.

RANGEL, D. E. N. et al. Visible light during mycelial growth and conidiation of *Metarhizium robertsii* produces conidia with increased stress tolerance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 315, n. 2, p. 81–86, 2011.

ROBERTS, D. W. World picture of biological control of insects by fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 3, p. 89–100, 1989.

RODRIGUEZ-ROMERO, J.; CORROCHANO, L. M. Regulation by blue light and heat shock of gene transcription in the fungus *Phycomyces*: proteins required for photoinduction and mechanism for adaptation to light. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1049–1059, ago. 2006.

SAKAMOTO, M.; INOUE, Y.; AOKI, J. Effect of light on the conidiation of *Paecilomyces fumosoroseus*. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v. 26, n. 435, p. 499–509, 1985.

SÁNCHEZ-MURILLO, R. I. et al. Light-regulated asexual reproduction *Paecilomyces fumosoroseus*. **Microbiology**, v. 150, n. 2, p. 311–319, 2004.

SANTOS, M. P. et al. Cold activity and tolerance of the entomopathogenic fungus *Toxopneustes* spp. to UV-B irradiation and heat. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, n. 3, p. 209–213, nov. 2011.

SCHROEDER, W. A. et al. Selection for carotenogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma* by dark-generated singlet oxygen. **Microbiology**, v. 142, p. 2923–2929, 1996.

- SHABANA, Y. M.; ELWAKIL, M. A.; CHARUDATTAN, R. Effect of nutrition and physical factors on mycelial growth and production of pigments and nonchromatic UV-absorbing compounds of *Alternaria eichhorniae*. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 1, p. 21–27, 2001.
- SHAH, F. A.; WANG, C. S.; BUTT, T. M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. v. 251, p. 259–266, 2005.
- SHINOHARA, M. L. et al. *Neurospora* Clock-Controlled Gene 9 (ccg-9) Encodes Trehalose Synthase: Circadian Regulation of Stress Responses and Development. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 1, p. 33–43, 1 fev. 2002.
- SINGH, D.; RAINA, T. K.; SINGH, J. Entomopathogenic fungi: An effective biocontrol agent for management of insect populations naturally. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 6, p. 830–839, 2017.
- SOSA-GOMEZ, D. R. **Essa lagarta gosta de soja**. 12. ed. [s.l.] Cultivar Grandes Culturas, 2000.
- SOUZA, R. K. F. **Hipoxia durante o crescimento micelial induz o aumento de tolerância de conídios de fungos entomopatogênicos ao calor e ao menadione**. 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade do vale do Paraíba, São José dos Campos, 2013.
- SOUZA, R. K. F. et al. Conidial water affinity is an important characteristic for thermotolerance in entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 448–461, 2014.
- STEVENSON, A. et al. Multiplication of microbes below 0.690 water activity: implications for terrestrial and extraterrestrial life. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 257–277, fev. 2015.
- SUNG, G.-H. et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, n. 1, p. 5–59, 2007.
- TAUBITZ, A. et al. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Current Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 354–360, 2007.
- THOMAS, D. C. et al. Sequence effect on incision by (A)BC excinuclease of 4NQO adducts and UV photoproducts. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 2, p. 365–370, 1991.
- TLECUITL-BERISTAIN, S. et al. Medium Selection and Effect of Higher Oxygen Concentration Pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* Conidial Production and Quality. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 387–394, 29 maio 2010.
- VASILIEVA, S. SOS Chromotest methodology for fundamental genetic research. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 435–440, set. 2002.
- VERMA, N. C.; SINGH, R. K. Stress-Inducible DNA Repair in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 20, n. 1,

p. 7, 2001.

VERMA, S.; IDNURM, A. The Uve1 Endonuclease Is Regulated by the White Collar Complex to Protect *Cryptococcus neoformans* from UV Damage. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 9, 2013.

WANG, C. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3223–3236, 1 out. 2005.

WANG, C.; DUAN, Z.; ST. LEGER, R. J. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 2, p. 302–309, 2008.

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 17, p. 6647–6652, 25 abr. 2006.

WANG, L. et al. Hydrogen Peroxide Acts Upstream of Nitric Oxide in the Heat Shock Pathway in Arabidopsis Seedlings. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 164, n. 4, p. 2184–2196, 1 abr. 2014.

WILLOCQUET, L. et al. Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelial growth of grape powdery mildew. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 5, p. 441–449, jun. 1996.

XIAO, G. et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v. 2, n. 1, p. 483, 2 dez. 2012.

YAJIMA, H. et al. A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light. **The EMBO journal**, v. 14, n. 10, p. 2393–9, 1995.

YANG, T.; DONG, C. Photo morphogenesis and photo response of the blue-light receptor gene *Cmwc-1* in different strains of *Cordyceps militaris*. v. 352, p. 190–197, 2014.

ZHAO, H. et al. Host-to-Pathogen Gene Transfer Facilitated Infection of Insects by a Pathogenic Fungus. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, 2014.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879–920, 2007.